

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina



**LINFOMA PRIMARIO DE LA MAMA:
CARACTERÍSTICAS GENERALES DE
UNA SERIE NACIONAL Y ANÁLISIS
MOLECULAR DEL SUBTIPO LINFOMA
DIFUSO DE CÉLULA GRANDE B.**

TESIS DOCTORAL

FERNANDO FABIO FRANCO PÉREZ

MADRID 2018

MEMORIA DE TESIS DOCTORAL



LINFOMA PRIMARIO DE LA MAMA: CARACTERÍSTICAS GENERALES DE UNA SERIE NACIONAL Y ANÁLISIS MOLECULAR DEL SUBTIPO LINFOMA DIFUSO DE CÉLULA GRANDE B.

Presentada por
Fernando Fabio Franco Pérez
Para la obtención del grado de Doctor por la Universidad Autónoma de
Madrid

Directores de tesis:
Prof. Dr. Mariano Provencio Pulla
Dra. Margarita Sánchez-Beato Gómez

“Aunque estudiaras medicina durante más de una vida, acudiría a ti gente cuyas enfermedades son misterios, porque la angustia que mencionas es parte integrante de la profesión de curar, y hay que aprender a vivir con ella. Aunque es verdad que cuanto mejor sea la preparación, mejor doctor puedes ser”
Noha Gordon

“Creo que los jóvenes reflexionan sobre cómo les gustaría que se desarrollara su vida, y cuando he hecho esto, siempre he llegado a la conclusión de que la vida no tiene que ser fácil, con tal de que no esté vacía”
Lise Meitner

AGRADECIMIENTOS

Mis primeras palabras de agradecimiento se dirigen a mis directores de tesis, el Dr. Mariano Provencio que ha creído en mi y me ha apoyado continuamente a lo largo de esta trayectoria que hemos podido recorrer juntos hasta llegar a feliz término. A la Dra. Margarita Sánchez-Beato por su paciencia y especial empeño, determinantes en la calidad y excelencia de este trabajo.

Quiero igualmente agradecer al Dr. Javier Lavernia Ginés, que ha sido un colaborador esencial de este proyecto desde que surgiera la propuesta de llevarlo a cabo y que me ha apoyado en todo momento.

Muchas gracias a mi compañera Julia González por toda su ayuda y por el esfuerzo que puso en enseñarme muchas cosas valiosas para este trabajo y por mantener siempre las ganas y la ilusión para que todo saliese bien.

Me gustaría agradecer también a Sagrario Gómez, Ana Royuela y Sandra Cerdeira, tres colaboradoras inigualables que desde diversos frentes estuvieron colaborando con este trabajo. Gracias a ellas por toda su dedicación y entusiasmo permanente.

Gracias a todos los miembros de GOTEL por su implicación e invaluable ayuda, por mantener viva las ansias de estudiar y mantener la línea investigativa, claves en el desarrollo de este estudio.

Gracias a mis compañeros del servicio de Oncología Médica del Hospital Universitario Puerta de Hierro, que de diferentes formas me han acompañado todo este tiempo.

Y finalmente doy inmensas gracias a toda mi familia, en particular a mis padres y hermanos que me han apoyado y animado durante toda mi vida, que han estado a mi lado en todo momento y para los que 7.775,48 km no son sinónimo de distancia, sino un motivo para unirnos más.

Esta tesis la dedico a mis padres y hermanos, en especial a mi hermano Esteban porque este logro también es de ellos.

Tabla de contenido

ÍNDICE DE FIGURAS, GRÁFICOS Y TABLA.....	13
ABREVIATURAS Y SIGLAS.....	17
RESUMEN	21
INTRODUCCIÓN	25
1. Aproximación histórica de los linfomas y clasificación histológica	27
2. Linfomas extraganglionares.....	30
<i>Definición.....</i>	<i>30</i>
<i>Epidemiología de linfomas extraganglionares</i>	<i>30</i>
3. Linfoma Primario de la Mama.....	33
<i>Definición.....</i>	<i>33</i>
<i>Incidencia.....</i>	<i>34</i>
<i>Presentación clínica.....</i>	<i>35</i>
<i>Diagnóstico y estadificación.....</i>	<i>35</i>
<i>Factores de riesgo asociados.....</i>	<i>38</i>
<i>Anatomía patológica.....</i>	<i>39</i>
<i>Factores pronósticos.....</i>	<i>42</i>
<i>Tratamiento del linfoma primario de mama.....</i>	<i>44</i>
4. Patogénesis del Linfoma Difuso de Células Grandes B	48
<i>Desarrollo de la célula B y la linfomagénesis</i>	<i>49</i>
<i>Clasificación según célula de origen.....</i>	<i>51</i>
<i>Características citogenéticas y moleculares</i>	<i>56</i>
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	59
MATERIAL Y MÉTODOS	63
1. Diseño del estudio.....	65
2. Población.....	65
<i>Criterios de inclusión.....</i>	<i>65</i>
<i>Criterios de exclusión</i>	<i>66</i>
3. Definición de las variables.....	66
<i>Pacientes y características clínicas</i>	<i>66</i>
<i>Cuaderno de recogida de datos (CRD)</i>	<i>67</i>

4.	Seguimiento clínico y valoración de repuesta	67
5.	Diseño de recogida de datos	68
6.	Desarrollo del estudio	69
7.	Análisis estadístico.....	69
	<i>Análisis descriptivo</i>	69
8.	Aspectos éticos.....	70
9.	Análisis moleculares	70
	<i>Características de las muestras</i>	71
	<i>Secuenciación masiva</i>	71
	<i>Técnica de secuenciación</i>	72
RESULTADOS		75
1.	Características de la serie de pacientes con linfoma primario de mama en España.	
	77	
	<i>Descripción clínica general</i>	77
2.	Análisis de supervivencia	84
3.	Análisis del estudio inmunohistoquímico y molecular.....	89
DISCUSIÓN		99
1.	Características generales de la serie.....	102
	<i>Tratamiento</i>	104
	<i>Tipos de respuesta al tratamiento de 1ª línea</i>	110
	<i>Patrón de recaída y tratamiento de rescate</i>	110
	<i>Supervivencia</i>	113
	<i>Factores pronósticos de recaída</i>	113
2.	Características anatomopatológicas	114
3.	Análisis molecular del subgrupo de pacientes con linfoma difuso de célula grade B primario de mama	117
CONCLUSIONES		135
BIBLIOGRAFÍA		139
ANEXO I: CUADERNO DE RECOGIDA DE DATOS INICIALES		159
ANEXO II: APROBACIÓN DE CEIC DE HUPHM.....		165
ANEXO III: CONSENTIMIENTO INFORMADO.....		167

ANEXO IV: COMUNICACIONES A CONGRESOS.....	173
ANEXO V: PUBLICACIONES	181

ÍNDICE DE FIGURAS, GRÁFICOS Y TABLA

Figura 1: Distribución de linfomas primarios extraganglionares según el órgano de origen.

Figura 2: Distribución de linfomas primarios extraganglionares según el órgano de sexo.

Figura 3: Distribución de tipos histológicos de linfomas primarios extraganglionares.

Figura 4: Imagen histológica del Linfoma primario de mama.

Figura 5: Clasificación Ann Arbor de los Linfomas primarios de mama.

Figura 6: Imagen esquemática de las dos formas de presentación del linfoma primario de mama asociado a prótesis.

Figura 7: Imagen esquemática del origen de la célula B.

Figura 8: Imagen esquemática de la célula de origen.

Figura 9: Imagen correspondiente al estudio de microarrays y subtipos de LDCGB según la célula de origen.

Figura 10: Algoritmo de Hans.

Figura 11: Algoritmo de Choi.

Figura 12: Algoritmo de Tally.

Figura 13: Proceso de emulsificación de la muestra en microTUBE Serew-Cap.

Figura 14: Diseño general del estudio de Linfoma primario de mama.

Figura 15: Distribución de los casos de linfoma primario de mama por tipo histológico.

Figura 16: Curvas de supervivencia global (Kaplan Meier).

Figura 17: Curvas de supervivencia libre de progresión (Kaplan Meier).

Figura 18: Curvas de supervivencia libre de progresión en función de la adición o no de antraciclinas al tratamiento de primera línea.

Figura 19: Curvas de supervivencia global en pacientes por grupos de edad del linfoma primario de mama.

Figura 20: Curvas de supervivencia global en pacientes según la agresividad del tumor.

Figura 21: Curvas de supervivencia libre de progresión en pacientes según la agresividad del tumor.

Figura 22: Frecuencias y distribución de las mutaciones en LDCGB-PM y CCO.

Figura 23: Relación total y por caso de mutaciones de PIM1 (Sinónimas vs No sinónimas) en pacientes con LDCGB-PM.

Figura 24: Representación esquemática de genes mutados en LDCGB-PM.

Figura 25: Representación esquemática de la estructura de PIM1 con la ubicación de las mutaciones puntuales clínicamente relevantes en LDCGB.

Figura 26: Representación esquemática de la acción de PIM1 en el control de proliferación y supervivencia de la célula.

Figura 27: Representación esquemática de la estructura de receptor TLR10 y ubicación de la mutación L265P de MYD88.

Figura 28: Esquema de la activación de vías de señalización dependientes e independientes de MYD88.

Figura 29: Comparación de resultados de frecuencias mutacionales entre nuestros resultados y series publicadas previamente.

Tabla 1: Clasificación de neoplasias linfoides maduras, histiocíticas y dendríticas de la OMS 2016.

Tabla 2: Clasificación por estadios de Ann Arbor.

Tabla 3: Series de Linfoma primario de mama publicados con más de 30 casos.

Tabla 4: International Porgnostic Index – IPI.

Tabla 5: Follicular Lymphoma International Porgnostic Index – FLIPI.

Tabla 6: Series de Linfoma primario de mama publicados con más de 30 casos con descripción del tratamiento administrado.

Tabla 7: Distribución de casos de linfoma primario de mama en España por centro y provincia.

Tabla 8: Características clínicas de los pacientes con LNH-PM según la agresividad del linfoma.

Tabla 9: Tipos de tratamiento en pacientes con LNH-PM según la agresividad del linfoma.

Tabla 10: Esquemas de quimioterapia usados en el manejo del LPM.

Tabla 11: Tipos de respuesta a la 1ª línea de tratamiento.

Tabla 12: Patrón de recaída del linfoma primario de mama.

Tabla 13: Análisis estadístico de supervivencia por estadios del LPM.

Tabla 14: Análisis estadístico de supervivencia por grupos de edad del LPM.

Tabla 15. Características clínicas de pacientes con LDCGB-PM incluidos en el estudio molecular.

Tabla 16. Resultados del estudio inmunohistoquímico, índice de proliferación y clasificación de COO.

Tabla 17: Relación de frecuencia de mutaciones por muestra y caso.

Tabla 18: Resultados del estudio molecular con la descripción de mutaciones somáticas halladas por caso y gen.

Tabla 19. Clasificación de la COO en pacientes con LDCGB-PM.

ABREVIATURAS Y SIGLAS

ABC: Activated B-cell

ABVD: Doxorubicina, bleomicina, vinblastina, dacarbazina.

ADN: ácido desoxirribonucleico

AFA: Adaptive Focused Acoustics

Ag: Antígeno

AID: activación inducida por ciclina deaminasa

BACOP: Bleomicina, epirrubicina, ciclofosfamida, vincristina, prednisona

BAG: Biopsia con aguja gruesa

BCL-2: leucemia/linfoma de célula B 2

BCL-6: leucemia/linfoma de célula B 6

BCR: B-cell receptor

BIA-ALCL: Breast Implant-Associated Anaplastic Large Cell Lymphoma

BMO: Biopsia de médula ósea

CEIC: Comité Ético de Investigación Clínica

CHOP: Ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, prednisona

CODOX-M/IVAC: Ciclofosfamida, cincristina, doxorubicina, altas dosis de metotrexate / Ifosfamida, etoposido, altas dosis de citarabina.

COMP: Ciclofosfamida, adriamicina liposomal, vincristina, prednisona

COSMIC: catálogo de mutaciones somáticas en cáncer

CNIO: Centro nacional de investigaciones oncológicas

CRD: cuaderno de recogida de datos

CSR: Class switch recombination

CSC: Cancer Stem Cell.

CVP: Ciclofosfamida, vincristina, prednisona

DHAP: Dexametasona, citarabina, cisplatino

ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group

EE: Enfermedad estable

EORTC: European Organisation for Research and Treatment of Cancer

ESHAP: etopósido, metilprednisona, citarabina, cisplatino

FFPE: Formalin Fixed Paraffin Embedded

FLIPI: Follicular Lymphoma International Prognostic Index

GCB: Germinal center B

GHSg: German Hodgkin Study Group

GOTEL: Grupo Español para el Tratamiento y Estudio de Linfomas

HUPHM: Hospital Universitario Puerta de Hierro de Majadahonda

Hyper-CVAD: Ciclofosfamida, vincristina, doxorubicina, dexametasona, metotrexato, citarabina

IC: intervalo de confianza

ICE: Ifosfamida, carboplatino, etoposido

IELSG: International Extranodal Lymphoma Study Group

Ig: Inmunoglobulina

IHC: inmunohistoquímica

IPI: International Prognostic Index

IVO: Instituto Valenciano de Oncología

LACG: linfoma anaplásico de célula grande

LB: Linfoma de Burkitt

LBZM: Linfoma B de la zona marginal

LCR: Líquido céfalo-raquídeo

LDCGB: linfoma difuso de célula grande B

LDCGB-ABC: linfoma difuso de células grandes B subtipo célula B activada

LDCGB-CG: linfoma difuso de células grandes B subtipo centro germinal

LCM: linfomas de células del manto

LDH: lactato deshidrogenasa

LF: linfoma folicular

LH: Linfoma de Hodgkin

LL: Linfoma linfoblástico

LLCP: linfoma linfocítico de células pequeñas

LNH: linfoma no-Hodgkin

LPM: Linfoma primario de mama

LYFO: Danish National Lymphoma Registry

MALT: Tejido linfoide asociado a mucosa

MuLV: Virus de la leucemia murina

NGS: Next generation sequencing

NOS: No especificado

OMS: Organización Mundial de la Salud

PAAF: Punción aspiración con aguja fina
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
PET: Tomografía por emisión de positrones
PM: Primario de mama
QT: Quimioterapia
R: Rituximab
RC: Respuesta completa
REAL: Revised European American Lymphoma
RedCap: Research Electronic Data Capture
RMN: Resonancia magnética nuclear
RP: Respuesta parcial
RT: Radioterapia
SEER: Surveillance, Epidemiology and End Result Program
SEOM: Sociedad Española de Oncología Médica
SG: Supervivencia global
SHM: Somatic hypermutation
SLE: Supervivencia libre de enfermedad
SLP: Supervivencia libre de progresión
SNC: Sistema nervioso central
SWOG: Southwest Oncology Group
TAC: Tomografía axial computarizada
TLR: Toll-Like receptor
TRG: Tasa de respuesta global
VIH: virus de inmunodeficiencia humana

RESUMEN

INTRODUCCIÓN:

El linfoma primario de mama (LPM) es una forma rara de neoplasia linfoide extraganglionar que representa el 1 % de los linfomas no Hodgkin y el 2,2 % de los linfomas extraganglionares. Generalmente se se presenta como una masa indolora de crecimiento progresivo con o sin afectación ganglionar ipsilateral. Fue descrito por primera vez en 1972 por Wiseman y Liao y fue definido como la infiltración de tejido mamario por linfoma con o sin afectación ganglionar ipsilateral en pacientes sin antecedentes de linfoma previo y enfermedad sistémica en el momento del diagnóstico. Más del 95 % de los casos corresponden al linfoma no Hodgkin tipo B y el tipo histopatológico más común es el linfoma difuso de células B grandes (LDCGB), que representa el 60-80 % de todos los casos. Otros subtipos menos frecuentes incluyen linfoma folicular y linfoma de zona marginal tipo MALT. El tratamiento del linfoma difuso de células B grandes primario de mama se basa en regímenes de quimioterapia como R-CHOP o tratamientos similares que permiten alcanzar supervivencias globales a los 5 años cercanas al 90 %.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS:

La incidencia del LPM en España es similar en proporción y distribución por subtipos a la registrada en las grandes series internacionales publicadas y existen factores clínicos y moleculares iniciales como la activación constitutiva de la vía de señalización NFκB en el linfoma difuso de célula grande B primario de la mama y que es compartido con el mismo subtipo de origen ganglionar, que están implicados en mecanismos de linfomagénesis y que son predictivos de la evolución de la enfermedad. Nuestros objetivos incluyen la descripción de las características clínicas de pacientes diagnosticados de LPM en España de la serie del grupo GOTEL y la determinación las alteraciones moleculares implicadas en la linfomagénesis del linfoma difuso de célula grande B primario de mama y establecer su potencial pronóstico en la evolución de la enfermedad.

MÉTODOS:

Se ha llevado a cabo un estudio de cohortes, multicéntrico y prospectivo en un grupo de 55 pacientes diagnosticados de LPM, tratados en 16 hospitales miembros del grupo Grupo Oncológico para Tratamiento y Estudio de Linfomas (GOTEL), diagnosticados y tratados entre marzo de 1989 y enero de 2016. Se ha realizado un análisis de las características clínicas, de tratamiento y supervivencia de los pacientes, con la posterior selección de una muestra de 17 casos de linfoma difuso de célula grande cuyas muestras han sido sometidos a secuenciación masiva con un panel predeterminado de 38 genes.

RESULTADOS:

Se han analizado un total de 55 pacientes diagnosticados de LPM estadios I_E y II_E, en 16 instituciones españolas (53 casos de linfoma no Hodgkin y 2 linfomas de Hodgkin). El 96,4 % de los casos correspondieron a mujeres con una mediana de edad de 69 años. El 58,2 % de los casos se estadificaron como estadios I_E y 41,8 % como estadios II_E. Los tratamientos recibidos administrados incluyeron radioterapia (36,3 %), quimioterapia (85,5 %) y rituximab (en 38 de los 45 pacientes CD20+ tratados con quimioterapia). La tasa de respuestas completas objetivas fue del 82,2 %, siendo la supervivencia global y libre de progresión a 5 años de 76 % y 73 % respectivamente.

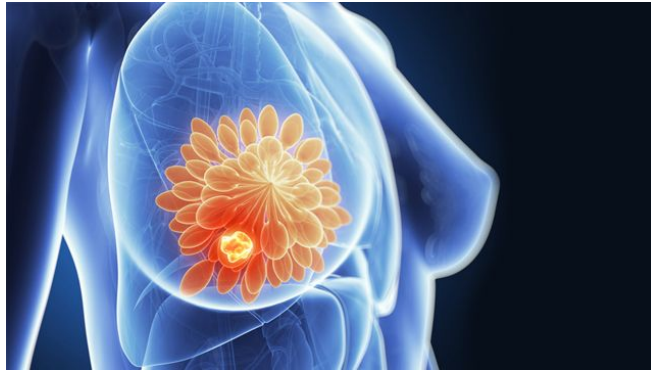
De los 17 casos de pacientes con LDCGB primarios de mama secuenciados, 75 % tenían estadio I_E y 29,5 % estadio II_E. El índice de proliferación, determinado por Ki-67 expresión fue sorprendentemente alta en estas muestras, siendo superior o igual al 80 % en 16/18 muestras. El 44 % de los casos corresponde a linfomas con genotipo centro germinal y 33,3 % a células B activadas. Después de la secuenciación de 18 muestras de los 17 pacientes incluidos en el estudio, se encontró un total de 52 no sinónimas y 21 mutaciones sinónimas. Los genes con mayor frecuencia de mutación incluyen *PIMI* (50 %), *MYD88* (39 %), *CD79B* y *CARD11* (17 %), *KMT2D*, *TNFIAP3* y *CREBBP* (11 %).

CONCLUSIONES:

- No existen factores clínicos pronósticos que permitan estratificar a los pacientes con linfoma primario de mama en grupos de riesgo.

- El uso de antraciclinas como parte del esquema de tratamiento de primera línea del linfoma primario de mama mejora la supervivencia libre de progresión y la supervivencia global a 5 años.
- La radioterapia puede considerarse como tratamiento exclusivo en pacientes seleccionados con linfoma primario de mama indolente.
- El LDCGB es el subtipo histológico más frecuente entre los casos de linfoma primario de mama y la alta frecuencia de mutaciones en *MYD88*, *CD79B* y *PIM1* sugiere que la activación de la vía NFκB puede ser importante en la linfomagénesis de esta entidad y plantea nuevas oportunidades terapéuticas a evaluar como la lenalidomida, BCR o inhibidores de NFκB o PIM1.

INTRODUCCIÓN



1. Aproximación histórica de los linfomas y clasificación histológica

Los linfomas son un amplio grupo de patologías neoplásicas relativamente frecuentes que en su gran mayoría se originan en los ganglios linfáticos u otros órganos linfoides como el bazo, el anillo de Waldeyer o el timo. Son neoplasias que derivan de diversas células del sistema inmune y por tanto existen diversos tipos histológicos, cada uno de ellos con un comportamiento biológico, evolución y pronóstico distintos. La primera descripción objetiva de una neoplasia linfoide fue realizada en el siglo XIX, más concretamente en el año de 1832 por el Dr. Thomas Hodgkin, un eminente médico y patólogo que publicó un trabajo descriptivo en el que expone detalladamente los hallazgos macroscópicos de autopsia de siete pacientes cuyo común denominador era la extensa afectación ganglionar linfática y esplénica. El análisis global de los casos, permitió al Dr. Hodgkin plantear la hipótesis de que este proceso patológico es consecuencia de un trastorno primario del sistema linfático, originado en los ganglios de tórax y abdomen, que no es atribuible a un proceso infeccioso o inflamatorio sistémico subyacente (Hodgkin T, 1832).

Fue en 1875 que Sir Samuel Wilks acuñó por primera vez el nombre de enfermedad de Hodgkin para referirse a este proceso neoplásico de los ganglios linfáticos, descrito previamente por su homólogo más de cuatro décadas antes y fue igualmente el primero en asociar a esta patología síntomas como la pérdida de peso, la sudoración nocturna y la fiebre, conocidos mas tarde como síntomas B (Wilks S, 1865). Posteriormente, el análisis microscópico de ganglios linfáticos de pacientes con enfermedad de Hodgkin permitió a Dorothy Reed y Carl Sternberg describir de forma detallada las células patognomónicas de la enfermedad y que se denominaron en su honor células de Reed-Sternberg (Sternberg C *et al*, 1898).

El avance a lo largo de los años del conocimiento de las características citológicas de los linfomas, ha permitido establecer que la llamada enfermedad de Hodgkin es un verdadero linfoma y como tal, junto a los linfomas no Hodgkin constituye uno de los dos grandes grupos de la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de las neoplasias linfoides, a pesar de que desde el punto de vista biológico son

entidades distintas (Swerdlow SH *et al*, 2008). Actualmente, más que las simples características citológicas y de estructura histológica de la enfermedad, el conocimiento de alteraciones moleculares específicas implicadas en la linfomagénesis y en la biología de la enfermedad, han permitido el desarrollo de clasificaciones cada vez más optimizadas, con grandes implicaciones pronósticas y terapéuticas. Todo esto, no solo ha hecho evolucionar los sistemas de clasificación, sino que también ha contribuido a la individualización y optimización de los tratamientos sistémicos y locales para cada subtipo histológico, mejorando las tasas de control de la enfermedad, la supervivencia libre de progresión (SLP) y supervivencia global (SG), así como en algunos casos los porcentajes de curación.

Con la finalidad de unificar criterios y definir un lenguaje médico concreto respecto a las neoplasias linfoides, en el año 2001 se publica la primera clasificación de la OMS de las neoplasias linfoides y que se constituye como un consenso mundial sobre el diagnóstico de estos tumores y por tanto una norma para patólogos, médicos y científicos (Jaffe ES *et al*, 2001). La aceptación internacional de las sociedades científicas de esta clasificación se justifica por el reconocimiento de una base biológica conocida, su relevancia clínica, practicidad y reproducibilidad en diversos escenarios a nivel mundial y es precisamente esta justificación la que determina que desde ese momento todos los estudios ya sea clínicos o preclínicos, adopten dicha clasificación para su desarrollo.

Lograr un consenso sobre la clasificación de los linfomas ha sido complejo; sin embargo, la consolidación de grupos de trabajo internacionales en diversas áreas del conocimiento médico y científico ha permitido llegar a ello basándose en el análisis conjunto de características morfológicas, inmunofenotípicas, genéticas, moleculares y clínicas, lo cual nos ha llevado al reconocimiento de enfermedades diversas con manejos y evolución independientes. Las bases de estos principios están cimentadas en la previa clasificación de la Revised European-American Lymphoma (REAL) publicado por el International Extranodal Lymphoma Study Group (IELSG) en 1994, la cual fue validada tras analizarse de forma sistemática una amplia serie de casos provenientes de varios países (Harris NL *et al*, 1994). Finalmente la última actualización disponible de la clasificación de la OMS, ha sido publicada en febrero de 2016 y es la que a partir de

ahora se deberá utilizar a nivel mundial tanto en la práctica clínica habitual, como en estudios de investigación clínicos y preclínicos (Tabla 1) (Swerdlow SH *et al*, 2016).

Table 1. 2016 WHO classification of mature lymphoid, histiocytic, and dendritic neoplasms

Mature B-cell neoplasms

Chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma
Monoclonal B-cell lymphocytosis*
B-cell prolymphocytic leukemia
Splenic marginal zone lymphoma
Hairy cell leukemia
<i>Splenic B-cell lymphoma/leukemia, unclassifiable</i>
<i>Splenic diffuse red pulp small B-cell lymphoma</i>
<i>Hairy cell leukemia-variant</i>
Lymphoplasmacytic lymphoma
Waldenström macroglobulinemia
Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS), IgM*
μ heavy-chain disease
γ heavy-chain disease
α heavy-chain disease
Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS), IgG/A*
Plasma cell myeloma
Solitary plasmacytoma of bone
Extraosseous plasmacytoma
Monoclonal immunoglobulin deposition diseases*
Extranodal marginal zone lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT lymphoma)
Nodal marginal zone lymphoma
<i>Pediatric nodal marginal zone lymphoma</i>
Follicular lymphoma
In situ follicular neoplasia*
Duodenal-type follicular lymphoma*
Pediatric-type follicular lymphoma*
<i>Large B-cell lymphoma with IRF4 rearrangement*</i>
Primary cutaneous follicle center lymphoma
Mantle cell lymphoma
In situ mantle cell neoplasia*
Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), NOS
Germinal center B-cell type*
Activated B-cell type*
T-cell/histiocyte-rich large B-cell lymphoma
Primary DLBCL of the central nervous system (CNS)
Primary cutaneous DLBCL, leg type
EBV ⁺ DLBCL, NOS*
<i>EBV⁺ mucocutaneous ulcer*</i>
DLBCL associated with chronic inflammation
Lymphomatoid granulomatosis
Primary mediastinal (thymic) large B-cell lymphoma
Intravascular large B-cell lymphoma
ALK ⁺ large B-cell lymphoma
Plasmablastic lymphoma
Primary effusion lymphoma
<i>HHV8⁺ DLBCL, NOS*</i>
Burkitt lymphoma
<i>Burkitt-like lymphoma with 11q aberration*</i>
High-grade B-cell lymphoma, with MYC and BCL2 and/or BCL6 rearrangements*
High-grade B-cell lymphoma, NOS*
B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between DLBCL and classical Hodgkin lymphoma
Mature T and NK neoplasms
T-cell prolymphocytic leukemia
T-cell large granular lymphocytic leukemia
<i>Chronic lymphoproliferative disorder of NK cells</i>
Aggressive NK-cell leukemia
Systemic EBV ⁺ T-cell lymphoma of childhood*
Hydroa vacciniforme-like lymphoproliferative disorder*
Adult T-cell leukemia/lymphoma
Extranodal NK-/T-cell lymphoma, nasal type
Enteropathy-associated T-cell lymphoma

Table 1. (continued)

Monomorphic epitheliotropic intestinal T-cell lymphoma*
<i>Indolent T-cell lymphoproliferative disorder of the GI tract*</i>
Hepatosplenic T-cell lymphoma
Subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma
Mycosis fungoides
Sézary syndrome
Primary cutaneous CD30 ⁺ T-cell lymphoproliferative disorders
Lymphomatoid papulosis
Primary cutaneous anaplastic large cell lymphoma
Primary cutaneous $\gamma\delta$ T-cell lymphoma
<i>Primary cutaneous CD8⁺ aggressive epidermotropic cytotoxic T-cell lymphoma</i>
<i>Primary cutaneous acral CD8⁺ T-cell lymphoma*</i>
<i>Primary cutaneous CD4⁺ small/medium T-cell lymphoproliferative disorder*</i>
Peripheral T-cell lymphoma, NOS
Angioimmunoblastic T-cell lymphoma
<i>Follicular T-cell lymphoma*</i>
<i>Nodal peripheral T-cell lymphoma with TFH phenotype*</i>
Anaplastic large-cell lymphoma, ALK ⁺
Anaplastic large-cell lymphoma, ALK ⁻ *
<i>Breast implant-associated anaplastic large-cell lymphoma*</i>
Hodgkin lymphoma
Nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma
Classical Hodgkin lymphoma
Nodular sclerosis classical Hodgkin lymphoma
Lymphocyte-rich classical Hodgkin lymphoma
Mixed cellularity classical Hodgkin lymphoma
Lymphocyte-depleted classical Hodgkin lymphoma
Posttransplant lymphoproliferative disorders (PTLD)
Plasmacytic hyperplasia PTLD
Infectious mononucleosis PTLD
Florid follicular hyperplasia PTLD*
Polymorphic PTLD
Monomorphic PTLD (B- and T-/NK-cell types)
Classical Hodgkin lymphoma PTLD
Histiocytic and dendritic cell neoplasms
Histiocytic sarcoma
Langerhans cell histiocytosis
Langerhans cell sarcoma
Indeterminate dendritic cell tumor
Interdigitating dendritic cell sarcoma
Follicular dendritic cell sarcoma
Fibroblastic reticular cell tumor
Disseminated juvenile xanthogranuloma
Erdheim-Chester disease*

Provisional entities are listed in italics.
*Changes from the 2008 classification.

Tabla 1. Clasificación de neoplasias linfoides maduras, histiocíticas y dendríticas de la OMS 2016. Tomado de The 2016 revision of the World Health Organization (WHO) classification of lymphoid neoplasms (Swerdlow SH *et al*, Blood. 2016).

La clasificación histológica descrita, se aplica no solo a los linfomas de origen ganglionar sino también a un grupo particular de neoplasias linfoides que se originan en tejidos distintos del sistema linfático; es decir, los linfomas extraganglionares.

2. Linfomas extraganglionares

Definición

El termino linfoma extraganglionar agrupa un amplio conjunto de linfomas de diversos tipos histológicos, que se originan en tejidos distintos del sistema linfático, timo, bazo, anillo de Waldeyer o de la médula ósea. Las controversias sobre la definición, se han planteado desde el inicio en relación a los casos en los que existe afectación ganglionar añadida. En 1961 Dawson propuso unos criterios estrictos refiriéndose al linfoma gástrico, el cual se debería considerar primario solo si afecta principalmente al estómago con o sin afectación de ganglios regionales (Dawson I *et al*, 1961). Posteriormente, algunos autores plantearon la posibilidad de incluir en esta categoría a pacientes con afectación de órganos contiguos como por ejemplo el bazo y el hígado en el caso del linfoma gástrico (Lewin K *et al*, 1978; Herrmann R *et al*, 1980). Aun en la actualidad existe divergencia entre los autores, de los cuales muchos insisten en clasificar como linfomas extraganglionares solo aquellos estadios I_E y II_E de Ann Arbor. Sin embargo, como toda neoplasia maligna los linfomas independientemente de su origen tienen el potencial de dar metástasis a distancia. Un dato clínico que se ha sugerido como indicador de un linfoma primario extraganglionar en presencia de afectación ganglionar asociada es el tamaño del componente tumoral en las dos localizaciones, asumiéndose que el determinante es volumen neoplásico en una de las localizaciones; es decir, que el tamaño tumoral sea mayor en la localización extraganglionar respecto al componente ganglionar (D'amore F *et al*, 1991).

Epidemiología de linfomas extraganglionares

La incidencia de los linfomas extraganglionares no está claramente determinada dadas las dificultades en la unificación de criterios en la definición. Sin embargo, los grandes estudios publicados hasta la fecha determinan que representan el origen primario de

entre el 24 y 48 % de los linfomas diagnosticados en países occidentales (Zucca *et al*, 1997; Zucca E *et al*, 1999; Krol *et al*, 2003). Existe una gran variabilidad en los datos epidemiológicos en diversas zonas del mundo, justificado en gran parte por la limitación en la recolección, unificación y análisis de registros de tumores locales y nacionales. Pero es muy probable que existan diferencias y variaciones relacionadas con las etnias, condiciones genéticas, medioambientales y de estilo de vida. En países del Golfo Pérsico, se ha reportado una incidencia particularmente alta de linfomas extraganglionares en contraste con los países occidentales, llegando en su caso a situarse entre un 42-45 % (Temmin L *et al*, 2004; Shome DK *et al*, 2004). Las localizaciones de origen más frecuentes son el estómago, piel, sistema nervioso central y hueso, mientras que las menos frecuentes son la mama, tracto genitourinario y estructuras ginecológicas (Zucca *et al*, 1997). El pronóstico y tratamiento dependerán no solo de la localización, sino también del subtipo histológico y el estadio al diagnóstico, sin clara diferencias según el género (figura 1 y 2).

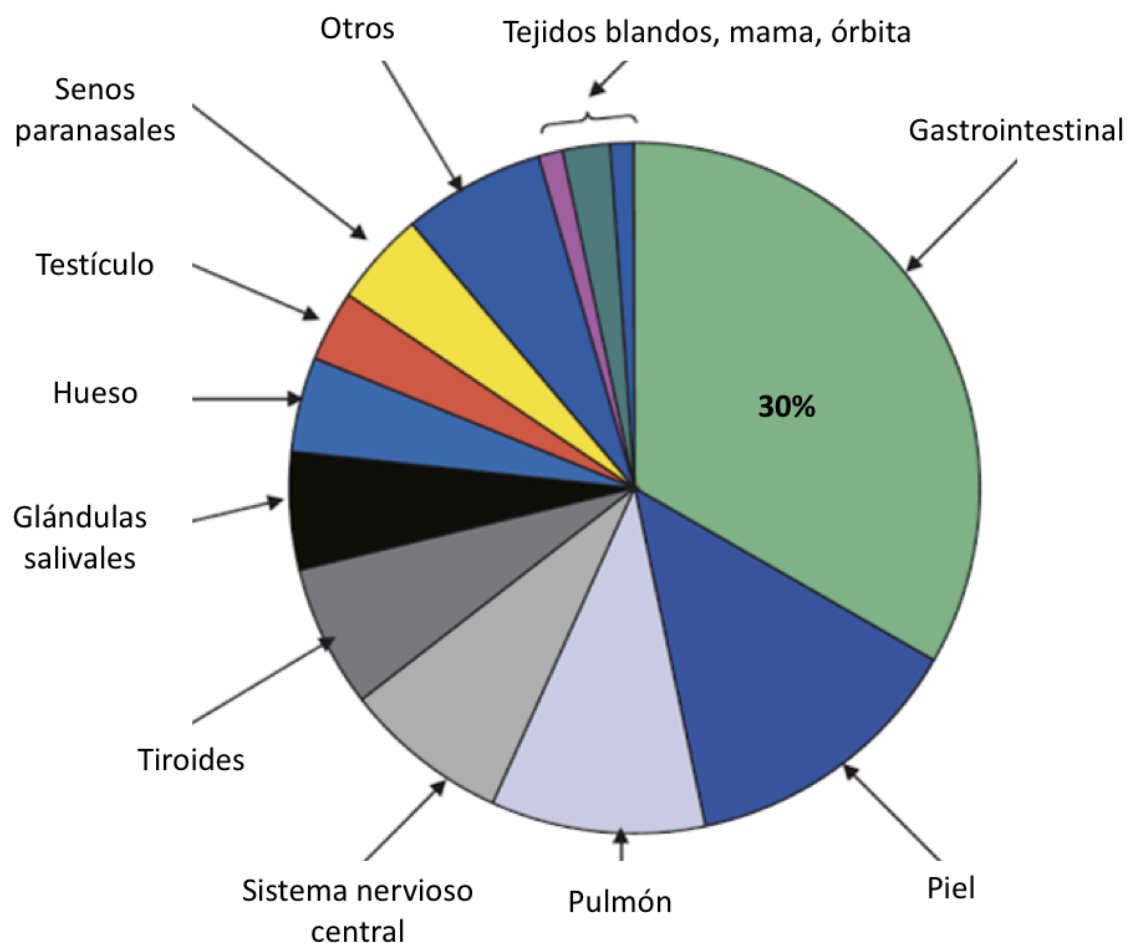


Figura 1. Distribución de linfomas primarios extraganglionares según el órgano de origen (datos del Grupo Danés de Linfomas – LYFO registry).

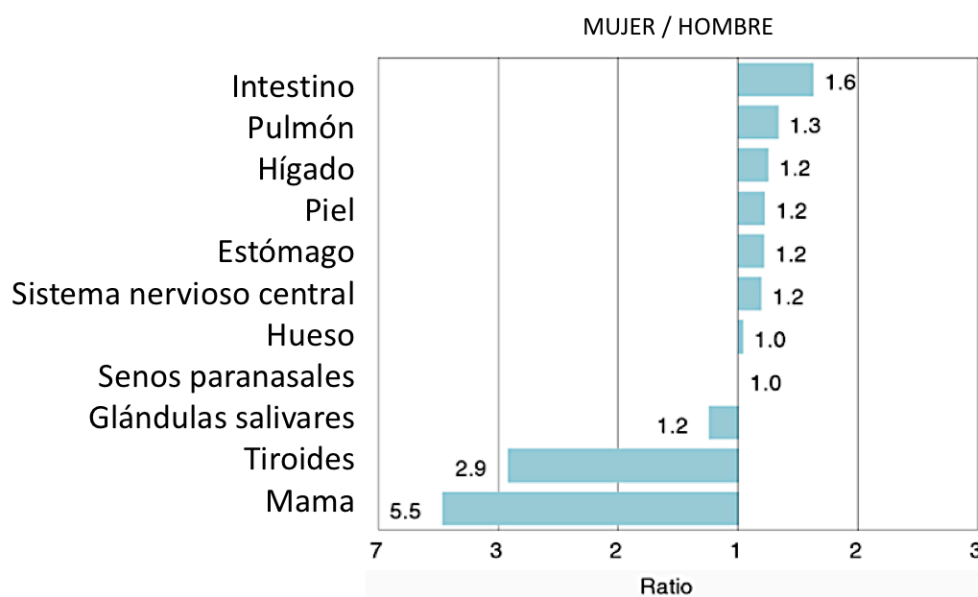


Figura 2. Distribución de linfomas primarios extraganglionares según el sexo (datos del Grupo Danés de Linfomas – LYFO registry).

En las diferentes publicaciones referidas a linfomas extraganglioneares, independiente de la población (occidente vs oriente), la mayor parte de estas neoplasias corresponden a Linfomas No Hodgkin (LNH), mientras que el Linfoma de Hodgkin (LH) solo representa entre el 2-5 % de todos los casos. En el año de 1991 se publica un análisis del grupo danés de linfomas con un registro de pacientes de 1257 casos nuevos de LNH, diagnosticados entre 1983 y 1988 (LYFO registry), de los cuales 463 correspondían a LNH primarios extraganglioneares (37 %). El 44 % de los casos estaba representado por linfomas de alto grado, 17 % de grado intermedio, 27 % de bajo grado y solo un 12 % no eran clasificables (D'amore F *et al*, 1991). La histología predominante fue el linfoma difuso de células grandes B (LDCGB) en más del 45 % de los casos, seguida del linfoma Folicular (LF) y el linfoma de tejido linfoide asociado a mucosa (MALT) (figura 3).

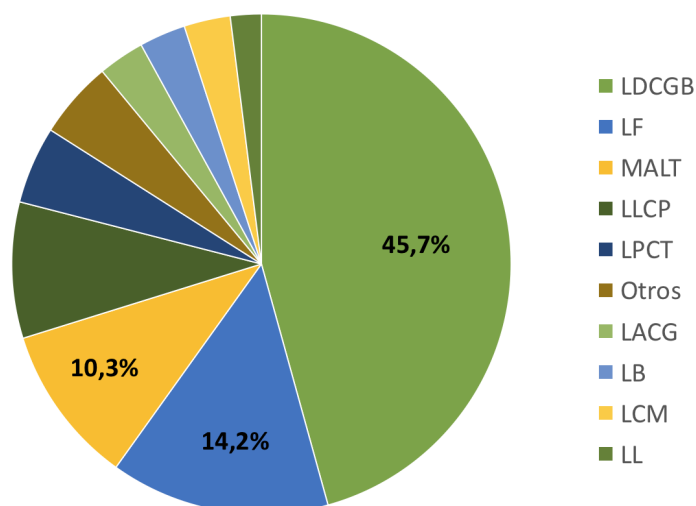


Figura 3. Distribución de tipos histológicos en linfomas primarios extraganglionares (datos del Grupo Danés de Linfomas – LYFO registry). LDCGB, Linfoma difuso de célula grande B; LF, Linfoma folicular; MALT, Linfoma de tejido linfoide asociado a mucosas; LLCP, Linfoma linfocítico de célula pequeña; LACG, linfoma anaplásico de célula grande; LB, linfoma Burkitt, LCM, linfoma de células del manto; LL Linfoma linfoblástico.

3. Linfoma Primario de la Mama.

Definición

El linfoma primario de la mama (LPM), es una rara presentación de los linfomas extraganglionares que puede afectar a una o ambas glándulas mamarias con o sin afectación ganglionar axilar ipsilateral. Fue descrito por primera vez como entidad independiente por Wiseman y Liao en el año de 1972, tras realizar un análisis detallado de 31 casos de pacientes mujeres diagnosticadas entre 1951 y 1970 de linfoma con afectación mamaria. Del total de los casos, solo 16 tenían afectación de una o ambas mamas con o sin afectación ganglionar local. De este primer trabajo, deriva la definición del linfoma primario de la mama como la infiltración por linfoma del tejido mamario que puede estar o no asociada a compromiso ganglionar local ipsilateral (Wiseman & Liao, 1972). Posteriormente, estos criterios fueron modificados en 1990 por Judith Hugh y colaboradores tras analizar una serie de 20 casos diagnosticados entre 1965 y 1988, propusieron como criterios para ser considerado como linfoma primario de la mama, la demostración de la infiltración del tejido mamario por linfoma, no haber afectación sistémica ni de otros órganos extraganglionares ni tener historia de linfoma

previo (Hugh JC *et al*, 1990). En ambos estudios la población era americana, el primero de ellos en Estados Unidos y el segundo en Canadá.

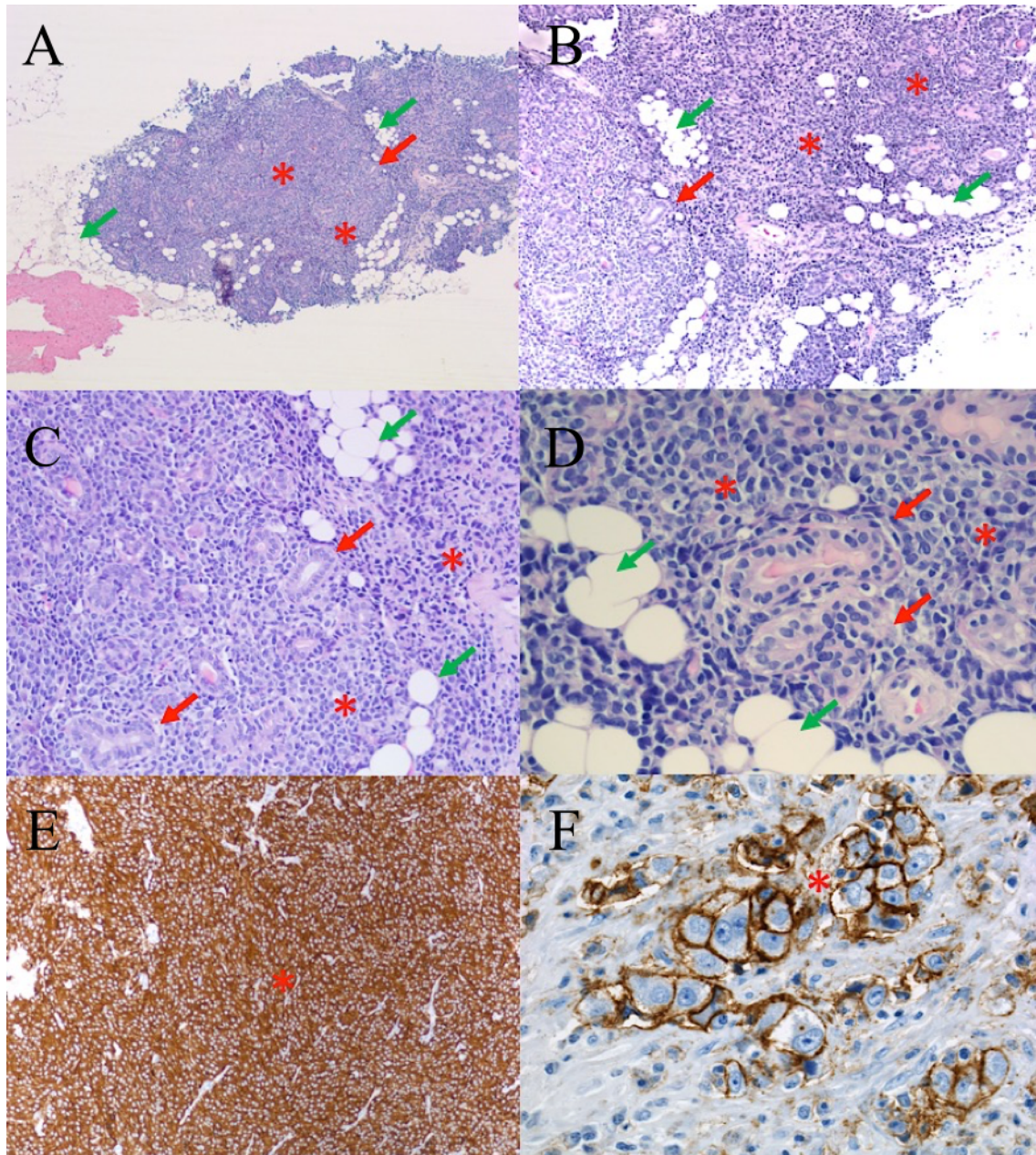


Figura 4. Imagen histológica del Linfoma primario de mama. Flecha roja: Ductos mamarios; flecha verde: tejido adiposo mamario; asterisco: células del linfoma. Las imágenes A-D corresponden a cortes teñidos con Hematoxilina eosina y las imágenes E-F a tinción de IHQ para CD20.

Incidencia

El linfoma primario de la mama constituye una forma infrecuente de presentación de los linfomas extraganglionares (Ryan G *et al*, 2007). Representa el 0,04-1 % de las

neoplasias malignas de la mama, 1,7-3 % de los linfomas extraganglionares y solo el 1 % de los LNH (Talwalkar S *et al*, 2008). Los datos disponibles actualmente proceden de bases de datos de tumores y reportes aislados de series y/o casos, lo cual no nos permite conocer la incidencia real del LPM, así como tampoco las diferencias que pueden existir en las diversas áreas geográficas del mundo.

Presentación clínica

En general, la media de edad de presentación se sitúan entre los 60-64 años en los países occidentales (Caon J *et al*, 2012; Cheah CY *et al*, 2014), mientras que en oriente es más temprana (45-53 años) aunque el rango de presentación es muy amplio (Au WY *et al*, 1997; Jung SP *et al*, 2013). Se manifiesta habitualmente como nódulo mamario palpable de crecimiento progresivo, no dolorosa, que puede o no acompañarse de adenopatías axilares ipsilaterales lo cual le hace clínicamente indistinguible de un carcinoma de mama. Le media de diámetro al diagnóstico es de 4-5 cm; sin embargo, se han descrito tumores muy voluminosos de hasta 20 cm (Cheah CY *et al*, 2014). Es poco habitual que se asocie a síntomas B, retracción cutánea o a telorrea. El tiempo de evolución de la enfermedad dependerá del tipo histológico, siendo los linfomas de histología agresiva de rápida evolución clínica como es el caso del LDCGB y del linfoma de Burkitt, en contraste con los de histología indolente como el linfoma folicular cuya evolución tiende a ser más larga y los síntomas más larvados. Es evidente, como toda enfermedad neoplásica sin tratamiento que la evolución natural de la neoplasia le confiere potencial metastásico que según algunos autores muestra predilección por el sistema nervioso central (SNC), aunque no hay datos suficientemente sólidos que apoyen dicha afirmación (Aviv A *et al*, 2013).

Diagnóstico y estadificación

Dadas las características clínicas de la enfermedad y su similitud en forma de presentación con las neoplasias primarias de mama de origen epitelial, generalmente las pruebas iniciales que se realizan incluyen la mamografía y ecografía mamarias (Surov A *et al*, 2012). De hecho, hasta el 20 % de los casos de LPM se diagnostican en el cribado de cáncer de mama tras la identificación de una lesión sospechosa de

malignidad (Lyou CY *et al*, 2007). Sin embargo, a pesar del esfuerzo por parte de los radiólogos, no existen datos imagenológicos patognomónicos en el linfoma primario de la mama. Autores como Sabaté, han analizado múltiples casos de linfomas de la mama tanto primarios como afectación secundaria basados en imágenes de mamografías y plantean como datos sugestivos de esta patología la presencia de lesiones tumorales mayores de 4 cm, ausencia de espiculaciones, calcificaciones y de distorsión arquitectural (Sabaté JM *et al*, 2002). Sucede de igual manera con las imágenes de resonancia magnética y ecografía, que no tienen un patrón determinado que diferencie de forma clara un linfoma mamario de un carcinoma (Wang L *et al*, 2015; Sousaris N *et al*, 2016).

El estudio histológico se realiza habitualmente mediante una biopsia con aguja gruesa, aunque en algunos casos el escaso material para estudio de inmunohistoquímica (IHQ), no permite llegar a un diagnóstico definitivo por lo que un subgrupo de pacientes deben ser intervenidos quirúrgicamente para la realización de una biopsia excisional. La estadificación se realiza mediante la clasificación de Ann Arbor (tabla 2). Para ello, el estudio de extensión como todo proceso neoplásico linfoide, debe incluir una tomografía axial computarizada (TAC) que incluya cuello, tórax, abdomen y pelvis o bien la realización de una tomografía por emisión de positrones (PET/TC) (Santra A *et al*, 2009; Yang WT *et al*, 2015). Según el tipo histológico y el estadio de deberá considerar igualmente la realización de biopsia de médula ósea (BMO) y citología de líquido cefalorraquídeo (Aviv A *et al*, 2013; Cheah CY *et al*, 2014). En el caso de la BMO, no está indicada de rutina dado que no existen datos consistentes que apoyen que en el LPM existe un riesgo incrementado de afectación metastásica a nivel del SNC (Aviv A *et al*, 2013).

CLASIFICACIÓN ANN ARBOR

Estadio I: afectación de una única región ganglionar (I) o de un único sitio u órgano extraganglionar (I_E)

Estadio II: afectación de dos o más regiones ganglionares en el mismo lado del diafragma (II) o afectación localizada de un sitio extraganglionar u órgano (II_E) y una o más regiones ganglionares en el mismo lado del diafragma.

Estadio III: afectación de regiones linfáticas ganglionares a ambos lados del diafragma (III), que pueden estar acompañadas por afectación localizada de un sitio u órgano extraganglionar (III_E) o esplénica (III_S) o de ambas (III_{ES})

Estadio IV: afectación difusa o diseminada de uno o más órganos extraganglionares distantes, con o sin afectación asociada de los ganglios linfáticos.

A: Sin síntomas B.

B: Con síntomas B (fiebre, sudoración nocturna y/o pérdida de más de peso >10 %).

Tabla 2. Clasificación Ann Arbor.

Hay que tener algunas consideraciones especiales al momento de aplicar la clasificación de Ann Arbor a los pacientes con LPM. Los estadios localizados (I_E y II_E) que son los que realmente se ajustan a la definición de Wiseman y Liao, se diferencian en si existe o no afectación ganglionar axilar. Algunos autores aceptan igualmente la afectación supraclavicular axilar ipsilateral; sin embargo, el principal motivo de controversia está en los casos de afectación de la mama contralateral la cual es considerada por unos autores como estadio II_E (Wiseman & Liao, 1972) y por otros estadio IV_E (Hugh J *et al*, 1990; Ryan G *et al*, 2008) (figura 4).

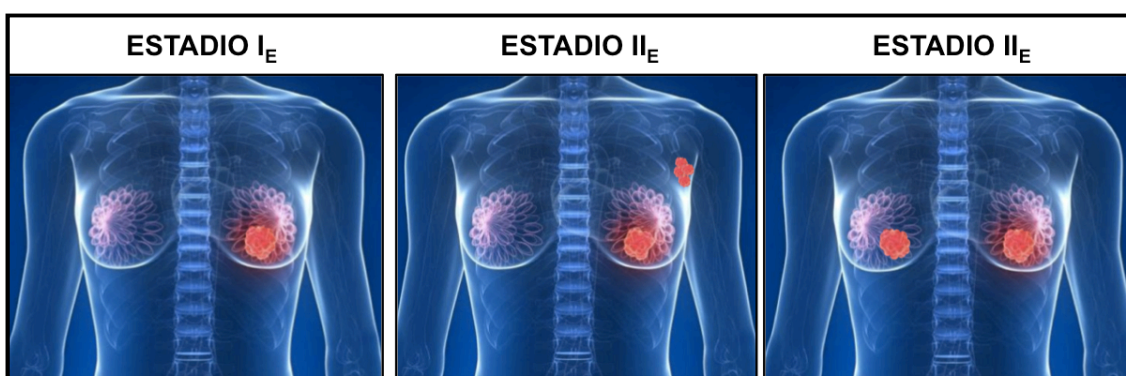


Figura 5. Estadificación Ann Arbor del linfoma primario de la mama. La afectación bilateral, por algunos autores se considera estadio II_E y por otros IV_E (no hay consenso).

AUTOR / AÑO	N	I-II _E	III-IV _E	EDAD MEDIA	RELACIÓN H/M	LDCGB I-II _E	PERIODO	PAIS
Ryan et al, 2008	204	193	11	64	5/199	193/204	1980-2003	Internacional
Talwalkar et al, 2008	106	50	56	61	1/105	32/50	1986-2007	USA
Avilés et al, 2005	96	96	0	56	ND	96/96	1988-1995	México
Mu-tai-Liu et al, 2005	93	74	19	57	0/93	63/93	1974-1999	Taiwán
Jeanneret Sozzi et al, 2008	84	79	5	64	1/83	ND	1970-2000	Internacional
Hosein et al, 2014	76	76	0	62	2/74	76/76	1992-2012	USA
Caon et al, 2012	50	50	0	64	0/50	25/50	1981-2009	USA
Validire et al, 2012	45	23	22	62	0/45	38/45	1986-2004	Francia
Guo HY et al, 2008	45	45	0	47	1/44	37/45	1991-2006	Japón
Kuper Hommel et al, 2003	38	38	0	65	0/38	21/28	1981-1999	Países Bajos
Ganjoo et al, 2007	37	23	13	53	0/37	18/37	1981-2005	USA
Zhao et al, 2011	31	31	0	54	0/31	28/31	1977-2007	China
Radkani et al, 2013	30	28	2	67	1/29	14/30	1981-2011	USA
Niitsu et al, 2008	30	30	0	57	0/30	ND	1998-2006	Japón

Tabla 3. Series publicadas con más de 30 casos de Linfoma primario de la mama. Algunas de las series también incluyen estadios III_E-IV_E que podrían ser una afectación secundaria de la mama por linfoma.

La mayor parte de las series publicadas muestran que existe una mayor afectación de la mama derecha (52-60 %), aunque no se conoce la probable causa de esta diferencia. Entre el 60 y 70 % de los casos debutan siendo estadio I_E y hasta un 15 % tienen compromiso bilateral. A diferencia de lo que ocurre en el linfoma primario testicular, la afectación bilateral en el LPM parece tener un comportamiento clínico más agresivo y por tanto un peor pronóstico (Aviv A *et al*, 2013). Por su parte, la clasificación histológica del LPM sigue la de la OMS para linfomas de origen ganglionar descrita previamente (Swerdlow SH *et al*, 2016).

Factores de riesgo asociados

La escasez de datos disponibles actualmente, no han permitido determinar claramente los posibles factores de riesgo implicados en el desarrollo del LPM. El hecho de que sea

una enfermedad que en su gran mayoría afecte a mujeres (>90 % de los casos), sugiere que puede existir un componente de hormonas sexuales implicado. Sin embargo, a pesar de que diferentes estudios han buscado evaluar la probable asociación de hormonas sexuales y el desarrollo de linfomas no Hodgkin, no se ha logrado evidenciar tal hipótesis dado que los resultados son discrepantes y cuestionables.

Otro de los factores que parece asociarse a un mayor riesgo de desarrollar un LPM son las enfermedades autoinmunes como la enfermedad de Sjogren y la tiroiditis de Hashimoto, como lo han planteado autores como Domchek en su serie publicada sobre linfomas de mama primarios y secundarios (Domchek SM *et al*, 2002; Baimpa E *et al*, 2009; Jonsson MV *et al*, 2014) y Nicola Avenia que describió el antecedente de tiroiditis autoinmune en 7 de 23 casos de pacientes con LPM (Avenia N *et al*, 2010).

Anatomía patológica

La clasificación histológica del linfoma primario de la mama, se corresponde con la propuesta por la OMS actualizada en 2016. El tipo histológico más frecuentemente diagnosticado es el LDCGB, el cual representa entre el 68-84 % de los casos seguido por el linfoma B de la zona marginal entre el 10-30 %, el linfoma folicular del 10 al 20 % y el linfoma de Burkitt en menos del 6 % de los casos (Cheah CY *et al*, 2014). Tipos histológicos menos frecuentes de LNH primarios de la mama incluyen el linfoma anaplásico CD30+, el linfoma linfocítico de célula pequeña y el linfoma del manto, entre otros. Merece una mención importante el LH que representa menos del 1 % de los casos y el denominado linfoma anaplásico de células grandes asociado a prótesis (Talwalkar S *et al*, 2008; Miranda R *et al*, 2014).

Si analizamos las características de los subtipos más frecuentes, podemos evidenciar que el LDCGB que comprende más del 60 % de todos los casos de LPM, es en su mayoría de tipo de células B activadas (en inglés *activated B-cell* - ABC) según la célula de origen lo cual constituye entre el 57 y el 95 % de estos casos (Niitsu N *et al*, 2008; Yhim HY *et al*, 2012). Es cierto que estas clasificaciones en la mayor parte de los casos están basadas en estudios de IHQ y los datos son muy limitados. En un estudio publicado en 2014 de un total de 76 pacientes con LDCGB primario de la mama (LDCGB-PM) (Hosein PJ *et al*, 2014), hubo disponibilidad para estudio de IHQ en 41 casos, de los cuales 83 % tenían positividad para BCL-2, 30 % para CD10, 92 % para

BCL-6 y 84 % para MUM1, datos que hacen parte del algoritmo de Hans para determinar el tipo de célula de origen del tumor. Por otra parte, en un grupo de 14 pacientes se realizó un estudio similar basado en técnicas de IHQ que permitió determinar igualmente que el tipo de célula de origen más frecuentemente identificado en el LPM es el non-GCB (Yoshida S *et al*, 2005). La información del tipo de célula de origen adquiere relevancia clínica al determinar un pronóstico menos favorable en pacientes con fenotipo ABC en aquellos pacientes con LDCGB de origen primario ganglionar y que podrían igualmente ser pronósticos en este mismo tipo de linfomas de extraganglionares.

En el caso de linfoma B de la zona marginal primario de mama (LBZM-PM), se caracteriza por ser un tumor que afecta generalmente a mujeres ligeramente mayores, sin haberse llegado a identificar hasta ahora ningún agente infeccioso implicado en la fisiopatología como ocurre en linfomas de este tipo pero de otros orígenes extraganglionares como el caso del *Helicobacter pylori* en el gástrico (Zucca E *et al*, 1998) o el de la *Chlamydia psittaci* en el tejido anexial ocular (Husain A *et al*, 2007). En un estudio realizado por el IELSG de los 278 pacientes diagnosticados de LPM, 24 casos (9 %) corresponden a LBZM-PM. Según el mencionado estudio, se comporta como una entidad indolente, de curso lento y supervivencias a 10 años cercanas al 50 % (Martinelli G *et al*, 2008). De forma similar ocurre en el caso de los linfomas foliculares primarios de mama (LF-PM) que comparten características clínicas con el LBZM-PM pero que tienen un peor pronóstico, con una supervivencia a 10 años de solo el 28 % según los datos del IELSG. Linfoma de Burkitt raramente afecta de forma primaria a la mama; sin embargo, sí se han descritos casos que generalmente afectan a mujeres jóvenes, durante el embarazo o durante el periodo de lactancia (Nomizu T *et al*, 1986; Horowitz NA *et al*, 2013). La media de edad de presentación son los 30 años y el hecho que se presente en periodos de importantes cambios hormonales como la gravidez y la lactancia pueden sugerir que las hormonas tengan un cierto papel en su patogénesis. Se caracteriza por ser un tumor muy agresivo, con una alta tasa de crecimiento y una gran capacidad de diseminación precoz. La mayor parte de los casos tienen afectación bilateral. Las biopsias muestran el tejido mamario infiltrado por una neoplasia con el típico patrón de cielo estrellado característico de este linfoma. El estudio de IHQ muestra fuerte positividad para CD20 y CD10, así como un alto índice de actividad mitótica. Característicamente muestra la translocación t(8; 14) (q24; q32) en el tejido

tumoral (Negahban S *et al*, 2010). En el trabajo realizado por Horowitz y colaboradores en el que se analizan un total de 101 casos de linfomas en pacientes en mujeres embarazadas, 39 de ellas fueron diagnosticadas de linfoma de Burkitt; es decir, el 38,6 % de los casos con una tasa de mortalidad en este grupo a los 6 meses del 61,5 % (Horowitz NA *et al*, 2013).

A pesar de que más del 90 % de los LPM se originan en células B, existe un nuevo subtipo que se asocia a implantes mamarios cuya célula originaria es de fenotipo T y se denomina linfoma anaplásico de células grandes asociado a implantes mamarios (en inglés *Breast implant associated anaplastic large cell lymphoma* - BIA-ALCL). El primer caso se describió en 1997 (Keech JA *et al*, 1997) y a partir de allí, se han publicado varias series y se han planteado estudios celulares para definir los mecanismos implicados en el desarrollo de este tipo de linfomas. Existen dos variantes clínicas del BIA-ALCL: el tipo más común que se presenta como un seroma y es indolente, en el cual se acumulan fluidos malignos de linfocitos T entre el implante y la capsula circundante y un tipo menos frecuente que se presenta como una tumoración nacida del tejido mamario que está en contacto con la prótesis y que puede o no estar acompañada líquido maligno circundante (Thompson PA *et al*, 2013) (figura 5). Los estudios de IHQ revelan que la célula tumoral es fuertemente positiva para CD30, mientras que es ALK negativo (Taylor CR *et al*, 2010).

La mediana de tiempo desde la colocación de la prótesis mamaria y el desarrollo del BIA-ALCL fue de 9 meses y más del 90 % de los casos se diagnostican en estadios localizados. La supervivencia a 3 años es del 100 % en los casos del BIA-ALCL tipo seroma y del 85 % para los casos tipo masa. Estudios en líneas celulares establecidas a partir de tumores primarios de este tipo demuestran que existe una dependencia de la IL-2 para la supervivencia y la proliferación, lo cual hace plantear que la inflamación crónica puede ser el principal potencial mecanismo fisiopatológico (Lechner MG *et al*, 2011).

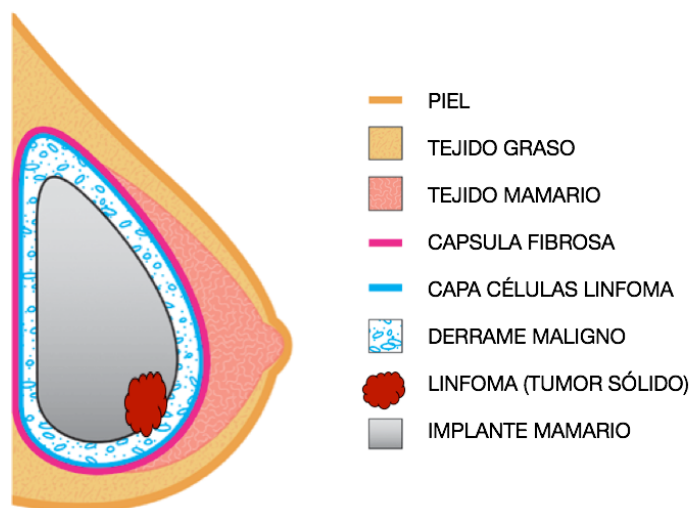


Figura 6. Imagen esquemática de las dos formas de presentación del linfoma linfoma anaplásico de células grandes asociado a implantes mamarios (BIA-ALCL).

Factores pronósticos

Establecer factores pronósticos en una patología poco prevalente no solo es difícil sino arriesgado, dado que la validación de estos y su reproducibilidad pueden no ser demostradas en toda la población afectada. Tal es el caso del LPM y por ello lo que se ha hecho es extrapolar datos de los índices pronósticos internacionales de los linfomas ganglionares según la histología y proponer a su vez potenciales factores propios que puedan ayudar al clínico en la toma de decisiones terapéuticas. Los índices pronósticos que realmente se están utilizando a día de hoy, propios de cada tumor y con las limitaciones clínicas que ello implica, son el International Prognostic Index – IPI (Ziepert M *et al*, 2010) para el LDCGB y el Follicular Lymphoma International Prognostic Index – FLIPI (Van de Schans SA *et al*, 2010; Rander T *et al*, 2010) para el LF (Tablas 4 y 5).

Cuando nos referimos específicamente a los factores que se han intentado determinar como propios del LPM, encontramos autores que proponen como principal factor el estadio de la enfermedad (Jeanneret Sozzi *et al*, 2008; Wong WW *et al*, 2002), siendo de peor pronóstico el estadio II_E frente al I_E. Otros de los factores de mal pronóstico descritos incluyen el tamaño tumoral mayor de 4-5 cm (Fukuhara S *et al*, 2011; Niitsu N *et al*, 2008) y la afectación mamaria bilateral (Ryan G *et al*, 2008; Guo HY *et al*, 2008). Existen igualmente descripciones de parámetros que podrían estar asociados a un mal pronóstico que consideramos menos relevantes dada la escasa muestra en las que se

han analizado como son el aumento de la velocidad de sedimentación globular > 30 mm/hora (Validieri P *et al*, 2009) o niveles séricos de IL2 soluble mayores de 1000 U/ml (Niitsu N *et al*, 2008).

INDICE PRONÓSTICO INTERNACIONAL (IPI)			
Edad > 60 años			
Niveles de LDH elevados			
ECOG ≥ 2			
Número de localizaciones extraganglionares ≥ 1			
Estadio III-IV			
Se da un punto para cada una de los ítems anteriores presentes en el paciente, para una puntuación total que varía de cero a cinco. El grupo inicial en el que fue validado incluía 2031 pacientes con LNH agresivo tratado con regímenes basados en antraciclina que no incluían rituximab, la SG a cinco años y la tasa de respuesta completa de acuerdo con la puntuación fue:			
Puntuación	Grupo de riesgo	SG a 5 años (%)	Tasa de RC (%)
0-1	Bajo	73	87
2	Intermedio bajo	51	67
3	Intermedio alto	43	55
4-5	Alto	26	44
Esta misma puntuación aplicada a 1063 pacientes con linfoma agresivo CD20 (+) tratado con rituximab más CHOP o CHOP-like quimioterapia la predicción es:			
Puntuación	SLE a 3 años	SLP a 3 años	SG a 3 años
0-1	81	87	91
2	69	75	81
3	53	59	65
4-5	50	50	59
INDICE PRONÓSTICO INTERNACIONAL (IPI) AJUSTADO A LA EDAD			
Para esta puntuación, todos los factores pronósticos enumerados anteriormente, con excepción de la edad y el número de sitios extraganglionares, reciben un punto, para una puntuación que va de cero a tres. Cuando se aplicaron al grupo de 761 pacientes > 60 años de edad, las tasas de SG y RC a 5 años según el puntaje ajustado fueron las siguientes:			
Puntuación	Grupo de riesgo	SG a 5 años (%)	Tasa de RC (%)
0	Bajo	56	91
1	Intermedio bajo	44	71
2	Intermedio alto	37	56
3	Alto	21	36

Tabla 4. International Prognostic Index (IPI), índice pronóstico del LDCGB. LDH: Lactato deshidrogenasa; SG: Supervivencia global; RC: respuesta completa.

ÍNDICE PRONÓSTICO INTERNACIONAL PARA LINFOMA FOLICULAR (FLIPI)			
Edad > 60 años			
Niveles de LDH elevados			
Hemoglobina < 12 g/dl			
Estadio Ann Arbor III-IV			
Número de localizaciones extraganglionares ≥ 4			
Puntuación	Grupo de riesgo	SG a 5 años (%)	SG a 10 años (%)
0-1	Bajo	91	71
2	Intermedio	78	51
3-5	Alto	52	36

Tabla 5. Follicular Lymphoma International Prognostic Index (FLIPI). LDH: Lactato deshidrogenasa; SG: Supervivencia global.

Tratamiento del linfoma primario de mama

CIRUGÍA

Al tratarse de una patología poco prevalente, no existe actualmente un consenso para el tratamiento del LPM. Desde que fuera descrito por primera vez en 1972 (Wiseman & Liao, 1972), esta entidad ha sido manejada de forma diversa. En muchos casos, el tratamiento inicial hace parte en realidad del diagnóstico de la lesión, dado que al ser confundido con un posible carcinoma de mama las técnicas diagnósticas empleadas son la biopsia con aguja gruesa (BAG) o la punción aspiración con aguja fina (PAAF) que son insuficientes para establecer con certeza la etiología del tumor y por ello es necesaria la resección quirúrgica de la masa. Las técnicas quirúrgicas utilizadas varían desde la tumorectomía hasta la mastectomía simple o radical, pasando por cuantrectomía y el recambio o retirada de las prótesis mamarias. Sin embargo, está más que demostrado que este tipo de intervención no tiene ningún impacto en términos de supervivencia de los pacientes (Jennings WC *et al*, 2007). Caso aparte es el concerniente al tratamiento del BIA-ALCL, en el cual la retirada de la prótesis es el primer manejo a realizarse (Miranda RN *et al*, 2014).

TRATAMIENTO DE QUIMIOTERAPIA

El tratamiento sistémico de QT ha demostrado disminuir significativamente las tasas de recaída local y a distancia, así como una mejora tanto en la SLP como en la SG en pacientes con LPM (Cao J *et al*, 2012). La mayor parte de los estudios hacen referencia

al LDCGB y es por tanto donde centraremos nuestro comentario de la QT. Como ocurre en el manejo del linfoma B de origen ganglionar, el tratamiento de elección tradicional y más estudiado es el esquema CHOP (Ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, prednisona), asociado actualmente a rituximab. Sin embargo, no es el único esquema utilizado y lo que parece ser importante es que el esquema contenga una antraciclina. En el estudio del IELSG con 204 pacientes con LDCGB-PM solo el 70 % recibió un esquema de QT que incluyó antraciclina y se ha podido evidenciar que los pacientes que no recibieron antraciclinas tienen peores tasas de SLP y SG (Ryan G *et al*, 2008). Existen otros esquemas de QT utilizados pero con mucha menor representación en los estudios que en la actualidad se usan en combinación con rituximab, como CVP (ciclofosfamida, vincristina, prednisona), COMP (ciclofosfamida, doxorubicina liposomal, vincristina, prednisona), MVP (mitomicina, vinblastina, cisplatino), BACOP (bleomicina, epirubicina, ciclofosfamida, vincristina, prednisona), ESHAP (etoposido, metilprednisolona, citarabina, cisplatino) y el ABVD (doxorubicina, bleomicina, vinblastina, dacarbazina) en el caso de los LH primarios de mama. En el caso del linfoma Burkitt solo disponemos de reportes de casos en los que evidentemente se han empleado diversos esquemas de QT de alta intensidad como el hiper-CVAD (ciclofosfamida, vincristina, doxorubicina, dexametasona e intratecales con metotrexato y citarabina), CODOX-M/IVAC (ciclofosfamida, vincristina, doxorubicina, altas dosis de metotrexato / ifosfamida, etoposido y altas dosis de citarabina) y el régimen del CALGB-9251 (Savvari P *et al*, 2010).

Rituximab es un anticuerpo monoclonal anti-CD20 que ha demostrado que en combinación con QT mejora de forma significativa las tasas de respuesta y la supervivencia en paciente con LNH. CD20 es un antígeno de membrana, una fosfoproteína no glucosilada localizada en los linfocitos pre-B y B maduros, tanto en células normales como en malignas, pero no en células progenitoras hematopéticas pro-células-B, células plasmáticas u otros tejidos normales. Este antígeno se expresa en la gran mayoría de los LNH de estirpe B (casi en el 95 % de los casos). El dominio Fab del rituximab se une al antígeno (Ag) CD20 y restablece funciones efectoras inmunes para mediar la lisis de las células B vía dominio Fc. Se ha demostrado que el efecto apoptótico está determinado por la capacidad del anticuerpo de generar citotoxicidad complemento-dependiente como resultado de la unión de C1q y la citotoxicidad celular anticuerpo-dependiente mediada por uno o más receptores Fcγ de la superficie de células inmunes como los granulocitos, macrófagos y células citotóxicas naturales

(Maloney DG *et al*, 1996). Igualmente rituximab actúa sobre la proliferación y diferenciación de las células linfoides malignas, regulando el ciclo celular e induciendo la apoptosis a través de los canales de calcio, la activación de proteínas tirosina cinasas, principalmente LYK y FYN, y la activación de la caspasa 3 (Mathers S *et al*, 2000). Dada la importante mejora que ha supuesto rituximab en los pacientes con LNH CD20+ de origen nodal, se ha introducido igualmente al tratamiento de los pacientes con LPM CD20+; sin embargo, los estudios en los que se ha analizado el impacto de este anticuerpo monoclonal en la supervivencia de los pacientes no parece que exista beneficio ni en términos de supervivencia ni de disminución de tasas de recaída en el SNC (Avilés A *et al*, 2007; Hosein PJ *et al*, 2014; Yhim HY *et al*, 2012). Sin embargo, estos resultados no se pueden generalizar dado que las muestras de pacientes son pequeñas y el poder estadístico limitado. En contraste, un estudio retrospectivo que analiza un grupo de 24 pacientes realizado en China, todas diagnosticadas de LDCGB-PM y tratadas con esquema CHOP con o sin rituximab, sugiere que la adición de rituximab al tratamiento puede tener impacto en términos de supervivencia frente a las que no lo reciben. La escasa muestra y el hecho de que solo el 41 % de las pacientes recibió el anti-CD20 hacen que el estudio no tenga un poder estadístico que confirme los resultados; sin embargo, la hipótesis queda abierta para futuras investigaciones (Zhang N *et al*, 2016).

TRATAMIENTO DE RADIOTERAPIA

La radioterapia (RT) es un tratamiento oncológico a valorar en los casos de LPM como consolidación a la QT. No todos los casos requerirán esta modalidad de tratamiento pero si es necesario plantearla en casos seleccionados. Se han publicado muchas series en las que la RT hace parte del tratamiento multimodal del LPM; sin embargo, menos de la mitad especifica el tipo de RT, los volúmenes y la dosis. Independientemente de ello, el análisis realizado por Jennings y colaboradores sobre un total de 465 pacientes, demostró que la adición de radioterapia dio como resultado una mejoría en la SG (47,9 % versus 37,1 %, $P = 0,07$) especialmente en pacientes sin afectación ganglionar axilar (Jennings W *et al*, 2007). En el estudio del IELSG el 64 % de los pacientes (130 de los 204) recibieron RT sobre el volumen mamario con o sin campo ganglionar, lo cual se asoció a mejoría en la SG mas no en la SLP. Estos resultados podrían estar justificados por el hecho de que más del 70 % de los pacientes solo tenían afectación glandular mamaria y no ganglionar y el impacto en SG podría haber sido efecto del tratamiento

multimodal en este subgrupo. En el caso de los pacientes con afectación ganglionar, no hubo impacto en SLP (Ryan *et al*, 2008). En resumen, si bien parece que la RT puede tener un importante papel en el tratamiento del LPM, no existen datos suficientemente sólidos para recomendarla en todos los casos y por tanto su uso debe ser individualizado.

AUTOR / AÑO	N	CIRUGÍA	QT	RT	R	RC y RCu	SLP (5 a)	SG (5 a)
Ryan et al, 2008	204	100 (49 %)	164 (80 %)	130 (64 %)	ND	89 %	58 %	63 %
Talwalkar et al, 2008	50	5 (10 %)	21 (42 %)	8 (16 %)	ND	ND	11 m	26 m
Avilés et al, 2005	96	0 (0 %)	66 (68.7 %)	30 (31.2 %)	0 (0 %)	88 %	ND	ND
Mu-tai-Liu et al, 2005	93	48 (52 %)	64 (69 %)	39 (42 %)	0 (0 %)	ND	48 %	56 %
Jeanneret Sozzi et al, 2008	84	60 (71 %)	59 (70 %)	51 (61 %)	0 (0 %)	ND	49 %	53 %
Hosein et al, 2014	76	7 (9.2 %)	62 (81.5 %)	48 (63 %)	48 (63 %)	91 %	67 %	78 %
Caon et al, 2012	50	6 (12 %)	28 (56 %)	13 (26 %)	12 (24 %)	ND	ND	52 %
Validire et al, 2012	38	0 (0 %)	38 (100 %)	27 (71 %)	4 (10 %)	89 %	54 %	61 %
Hai-Yi et al, 2008	45	10 (22 %)	43 (95.5 %)	21 (46.6 %)	6 (13.3 %)	67 %	35 %	50 %
Kuper Hommel et al, 2003	38	26 (68 %)	16 (42 %)	20 (53 %)	0 (0 %)	68 %	ND	45 %
Ganjoo et al, 2007	37	1 (3 %)	17 (46 %)	12 (32 %)	5 (13 %)	ND	61 %	82 %
Zhao et al, 2011	31	31 (100 %)	31 (100 %)	20 (64.5 %)	ND	ND	46 %	71 %
Niitsu et al, 2008	30	ND	30 (100 %)	10 (33 %)	11 (36 %)	96 %	77 %	87 %

Tabla 6. Estudios con más de 30 casos de LPM que describen el tratamiento administrado. N: número; QT: quimioterapia; R: Rituximab; RT radioterapia; RC: respuesta completa; SLP: supervivencia libre de progresión; SG: Supervivencia global; ND: no datos.

TRATAMIENTO EN LA RECAÍDA

Si consideramos que el LPM es una entidad rara en la que no tenemos datos prospectivos y comparativos de tipos de tratamiento en primera línea, el caso del manejo de la enfermedad en recaída se constituye en un terreno aún menos claro. Sin embargo, la experiencia en el manejo de la enfermedad en recaída o refractaria de los linfomas de origen ganglionar, nos ha permitido abordar de forma segura los casos y alcanzar tasas de respuestas completas similares a las que se logran en primera línea (Gisselbrecht C *et al*, 2010). El primer aspecto a tener en cuenta es el patrón de recaída, si se trata de una recaída local, en mama contralateral o sistémica, y si tiene o no compromiso del sistema nervioso central. En el caso de los linfomas de bajo grado, se puede plantear el uso de la RT local como tratamiento radical en aquellas pacientes que previamente no han recibido tratamiento de irradiación consolidativa tras el tratamiento sistémico de QT, con buenas tasas de respuesta. El caso particular en el que existe recaída con afectación del SNC debe abordarse de forma multidisciplinar (Aviv A *et al*, 2013). En primera instancia, es fundamental el control de la enfermedad tanto a nivel central como sistémico y por lo tanto el tratamiento de elección es de QT, salvo casos concretos que comentaremos posteriormente. El uso de la RT no es sistemático, se debe ajustar a las condiciones de cada paciente y se puede utilizar desde el inicio en aquellos pacientes con grandes masas o con lesiones que condicionen obstrucción del flujo normal del líquido cefalorraquídeo (LCR) y por tanto amenacen a muy corto plazo la vida del paciente. La técnica utilizada dependerá del caso, reservando el tratamiento holocraneal como terapia de salvamento.

4. Patogénesis del Linfoma Difuso de Células Grandes B

Los estudios de los que disponemos actualmente para comprender la patogénesis del LDCGB en general, derivan de grandes series de pacientes con linfomas de origen ganglionar en las que se analizan los factores moleculares implicados en la linfomagénesis y los cambios biológicamente necesarios en etapas posteriores para determinar la evolución de la enfermedad y su respuesta a tratamientos. Este conocimiento ha sido aplicado también a los casos de LDCGB de origen extraganglionar que por su baja incidencia han visto limitado el desarrollo de estudios similares que permitan clarificar si comparten o no los mismos mecanismos biológicos

que determinan la evolución de los de origen ganglionar. La especial introducción de estudios con perfiles de expresión génica han permitido determinar las vías oncogénicas implicadas en los procesos de origen y evolución de los linfomas y adicionalmente han permitido distinguir nuevos subtipos moleculares que por las técnicas histológicas convencionales no son diferenciables y que ya se consideran de importante valor pronóstico y esperamos se traduzcan en mejoras en la selección de tratamientos para aumentar las tasas de SLP y SG.

Desarrollo de la célula B y la linfomagénesis

Los linfomas de células B se originan en diferentes etapas del desarrollo de los linfocitos B. El desarrollo de esta célula B se inicia en las estructuras linfoideas primarias a partir de células madres hematopoyéticas pluripotenciales en un contexto libre de antígenos en médula ósea. Los progenitores van diferenciándose y migrando hacia el interior de la médula, estableciendo diversas interacciones con las células estromales en un proceso llamado linfopoyesis de células B y cuyo objetivo es la producción de células dotadas de receptores de antígeno funcionales, idóneas para proseguir con su diferenciación hasta convertirse en una célula madura con su receptor de célula B (en inglés *B-cell receptor* o BCR) correctamente reordenado. Estos linfocitos B desarrollados en médula ósea y en el hígado fetal a partir de células progenitoras, reordenan segmentos génicos que codifican para el BCR, generando receptores específicos y distintos en cada célula B individual, con el fin de generar una población diversa de células B versátiles y con la capacidad de reconocer diversas señales antigénicas para producir genes del BCR exclusivos de cada célula. En los precursores de los linfocitos B, los factores de transcripción EBF y E2A inducen el factor de transcripción PAX-5, iniciándose la diferenciación del linaje B. En este momento, el locus de la región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina (Ig) pasa de una configuración cromatínica cerrada a una más abierta y accesible a las enzimas catalizadoras del reordenamiento génico, las recombinasas RAG-1 y RAG-2, que son necesarias para el reordenamiento de los genes de cadena pesada (McHeyzer-Williams MB, 2008). El gen de la cadena pesada de la Ig se origina por la transposición o reordenamiento de segmentos génicos de la región variable (V) con segmentos génicos de diversidad (D) y de unión (J) que producen un exón. Las células que realizan un

reordenamiento productivo de los genes de cadena pesada logran que los receptores de la célula pre-B se expresen en su membrana plasmática. Estos receptores son complejos formados por la cadena pesada reordenada que están compuestos por proteínas sustitutas de la cadena ligera, Ig α e Ig β . Durante este proceso, sólo las células que han adquirido genes de región variable de cadena ligera que pueden ser traducidos sobrevivirán, mientras que todas las demás entrarán en apoptosis (Rajewsky K, 1996). Tras el paso de todos estos procesos la célula B expresa IgM de membrana, por tanto hablamos de célula B inmadura que seguidamente se expondrá a una selección negativa de células autorreactivas. Si la célula B inmadura no reacciona con los antígenos presentes en la médula ósea, se transformará en una célula madura que sale a la periferia donde se somete a una segunda selección. Las células autorreactivas a antígenos propios periféricos serán eliminadas, finalizando así la primera fase de diferenciación celular B. La activación de la célula B inducida por antígenos se da en el centro germinal con la estimulación de CD40L que produce la activación de la enzima Citidina deaminasa (AID), esencial para que se produzcan al menos dos procesos distintos que modificarán el ADN. Estos dos procesos dependientes de AID son los de hipermutación somática (en inglés *somatic hypermutation* - SHM) y la conmutación de clase de Ig (en inglés *class-switch recombination* - CSR). La SHM modifica la región variable de Ig mediante la introducción de mutaciones, pequeñas deleciones o inserciones para producir anticuerpos con mayor afinidad por la inmunización, mientras que la CSR genera en la cadena pesada cambios de clase de IgM a IgG, IgA o IgE. Finalmente las células B se diferenciarán en células B de memoria o células plasmáticas (Nogai H *et al*, 2011) (figura 6). Alteraciones persistentes y no corregidas en cualquier parte del proceso de desarrollo y diferenciación del linfocito B pueden degenerar en el origen de los linfomas. Siendo los puntos más críticos los procesos de recombinación V(D)J, la hipermutación somática y la CSR. Caso especialmente relevante es la translocación t(14;18) que ocurre durante la recombinación V(D)J y que se detecta en prácticamente todos los pacientes con LF y una fracción de LDCGB.

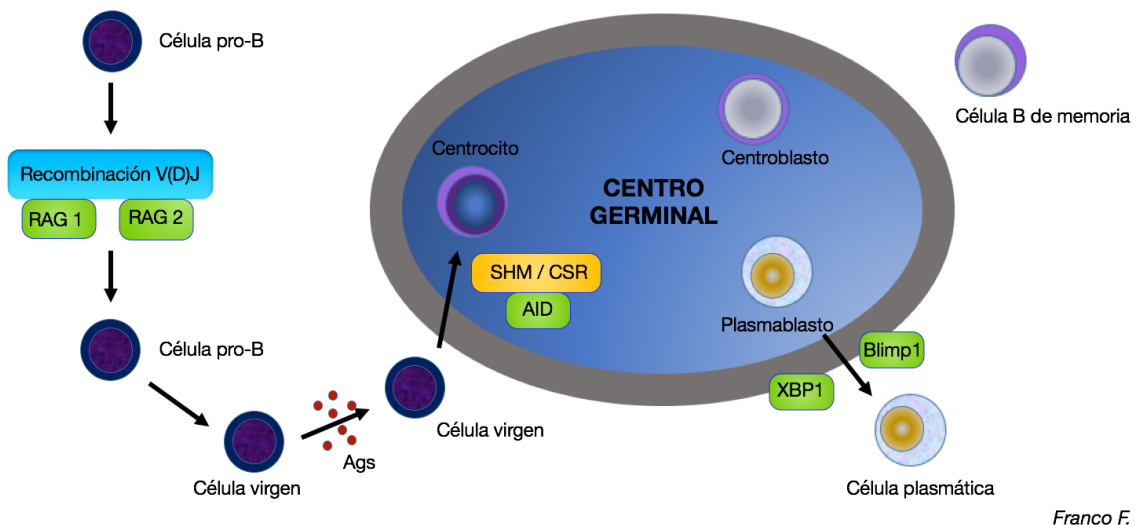


Figura 7. Imagen esquemática del origen de la célula B. Ags: antígenos; RAG1/2: genes de activación recombinante; SHM: Somatic hypermutation; CSR: class-switch recombination; AID: activation-induced cytidine deaminase; XBP1 / Blimp1 (*PRDM1*): reguladores de la diferenciación plasmocítica.

Clasificación según célula de origen

Los avances a los que asistimos en los últimos años en biología molecular, sobre todo en estudios de proteómica y genómica, nos han abierto el camino para identificar distintos subtipos moleculares del LDCGB. Tal es el caso de los estudios realizados por Alizadeh, que utilizando microarrays pudo caracterizar perfiles de expresión génica y pudo definir dos claros subtipos del LDCGB. El primero de ellos, que expresa genes propios de las células B de centro germinal y por tanto denominado LDCGB “de célula B de centro germinal” (en inglés *germinal center B* - GCB) y en cuyos estudios representaba entre el 45-50 % de los casos. El segundo subtipo con expresión de genes normalmente inducidos durante la activación in vitro de las células B periféricas, que se denominó “de célula B activada” (en inglés *activated B-cell* - ABC). Un pequeño grupo de casos no pudo ser clasificado según los criterios anteriores, por lo que se denominó “tipo 3” o no clasificable (Alizadeh *et al*, 2000) (figura 7).

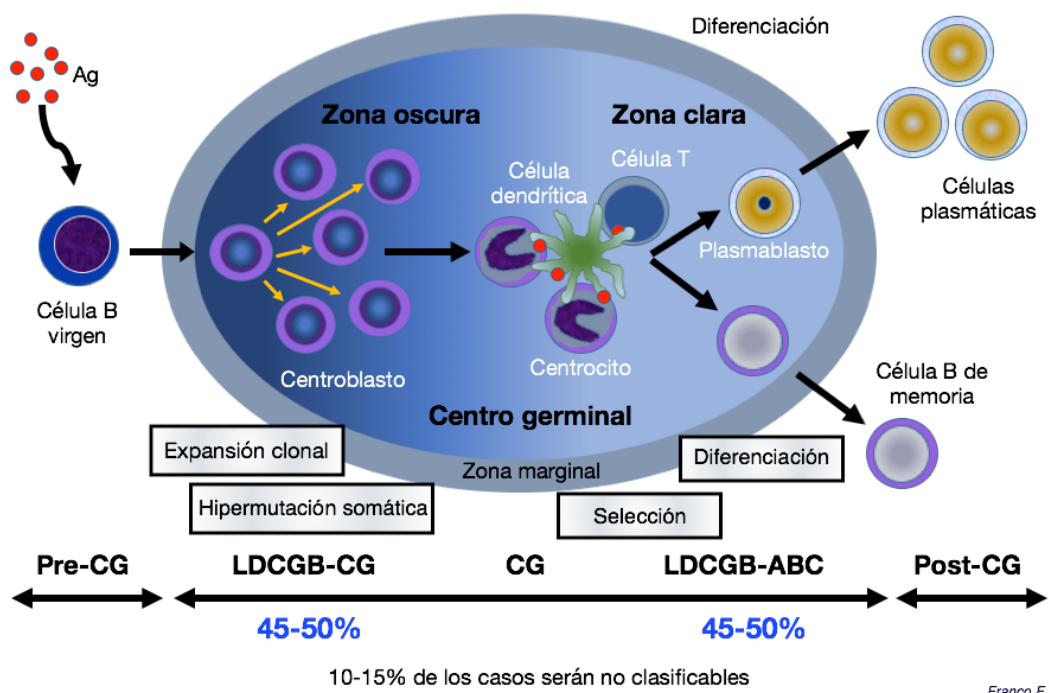


Figura 8. Imagen esquemática de la célula de origen.

La importancia de esta nueva clasificación de los linfomas radica en que tiene implicaciones pronósticas y de supervivencia tanto libre de progresión como global, siendo el subtipo ABC considerado de peor pronóstico. Posteriormente, en el año 2002 otro grupo comunicó resultados realizados en una cohorte de 240 pacientes con LDCGB cuyas muestras se sometieron a estudios moleculares con microarrays y comparadas con el IPI. Los resultados permitieron identificar 3 subgrupos de pacientes que se correlacionan y confirman los resultados de Alizadeh et al, además de identificar dos eventos oncogénicos comunes del grupo de pacientes GCB, la translocación de *BCL-2* y amplificación de *c-rel*. Al contrastar los resultados del estudio de microarrays con la supervivencia de los pacientes, se pudo determinar que el subtipo GCB tiene mayores tasas de supervivencia a 5 años. Se utilizaron 17 genes para construir un predictor de la supervivencia global tras el tratamiento de QT. Este predictor genético y el IPI fueron indicadores pronósticos independientes (Rosenwald A et al, 2002). En 2015, fueron publicados los resultados de un estudio de 344 pacientes diagnosticados de LDCGB y tratados de forma uniforme con R-CHOP. Se realizó un estudio molecular para definir la reproducibilidad de la identificación célula de origen (en inglés *cell-of-origin* - COO) utilizando el ensayo Lymph2Cx con una plataforma de 20 genes en la muestra inicial de parafina (Scott D et al, 2014). Igualmente se evaluó la expresión de MYC y BCL-2

mediante IHQ y microarrays. Los resultados mostraron una concordancia en la identificación de la COO en el 96 % de los casos y se pudo definir que los resultados del tratamiento son significativamente peor en el subgrupo ABC, independiente de la puntuación de IPI y la doble expresión de MYC / BCL-2 por IHQ (Scott D *et al*, 2015). Por tanto, estos y otros estudios nos confirman que la determinación de la COO es de vital importancia al momento de evaluar el pronóstico de la enfermedad y que deberá en estudios aleatorizados estudiarse el impacto de los tratamientos basados en el subtipo según la COO (Roschewski M *et al*, 2014) (figura 8).

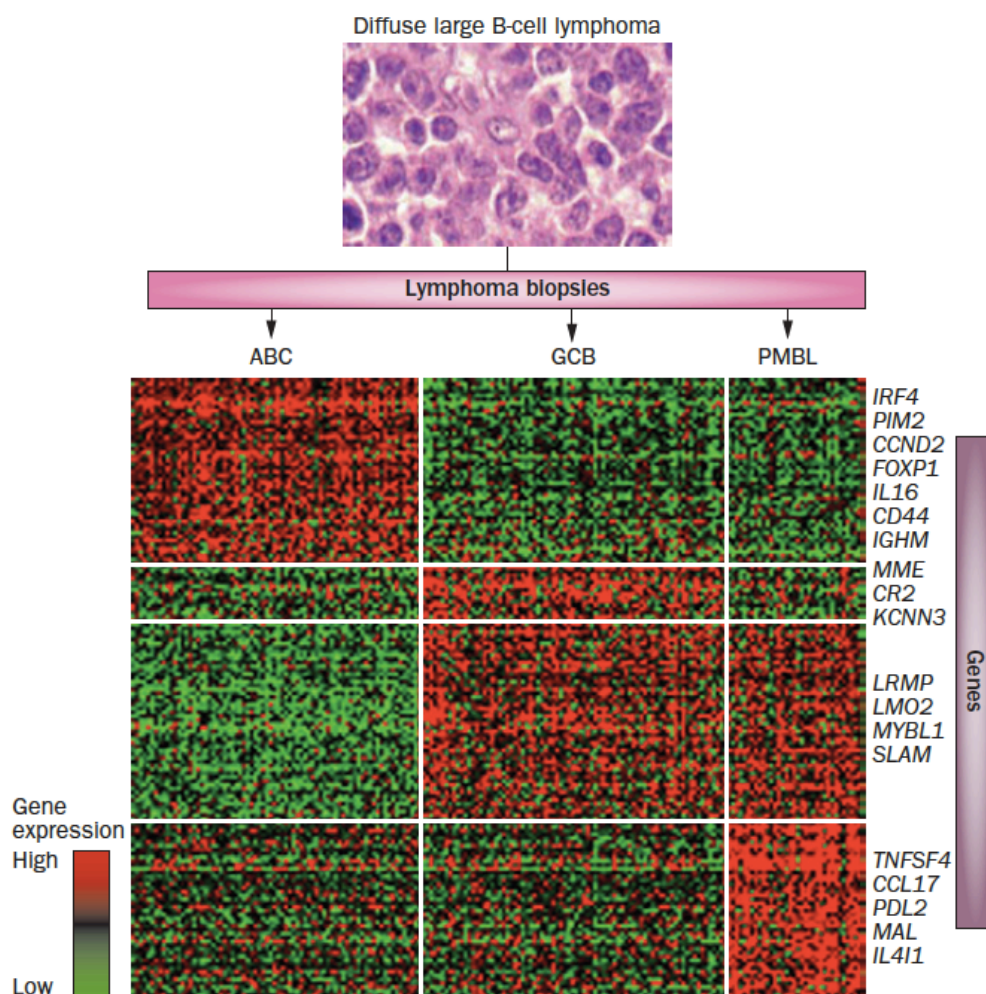


Figura 9. Imagen correspondiente al estudio de microarrays con la consecuente identificación de los subtipos de LDCGB según la COO, cuya estructura histopatológica es indistinguible para el patólogo. Tomado de Nat Rev Clin Oncol. 2014;11(1):12-23.

Ahora bien, una vez conocida la importancia de la COO en el LDCGB nos enfrentamos al hecho de la aplicabilidad de esta información en la práctica clínica diaria. Está claro que actualmente no se puede subclasificar los LDCGB de forma sistemática según la COO por técnicas moleculares complejas y por tanto, se han desarrollado y validado algoritmos basados en estudios de IHQ que permiten hacer una aproximación de esta clasificación pero con claras limitaciones. Los algoritmos más utilizados y ya validados son los de Hans y Choi. El primero de ellos utiliza anticuerpos frente a CD10, BCL-6 e IRF4/MUM1. Según lo cual los casos positivos para BCL-6 y CD10 son considerados GCB por ser marcadores de células B de centro germinal (incluye casos positivos para solo CD10 o para BCL-6 y CD10). Aquellos casos negativos, se consideran parte del subgrupo no-GCB (Hans CP *et al*, 2004). En este punto, cabe recordar que en el caso de que la determinación de la COO se realice por IHQ, no es posible hablar de subtipo ABC, sino de no-GCB. Debido a que MUM1 se expresa en las células plasmáticas y en las etapas posteriores del desarrollo de las células B, asociándose su expresión con el grupo ABC en estudios de perfiles de expresión génica, en los casos de positividad para BCL-6 y negatividad para CD10, la expresión de MUM1 determinaría el grupo, asignándose subtipo no-GCB en caso de positividad (figura 9). Sin embargo, al contrastar los datos que aporta el algoritmo de Hans con los resultados de estudios con microarrays, demuestran que la concordancia real varía entre el 76-86 % (Meyer PN *et al*, 2011; Nara Y *et al*, 2017), quedando demostradas las limitaciones de estos algoritmos al momento de determinar la COO.

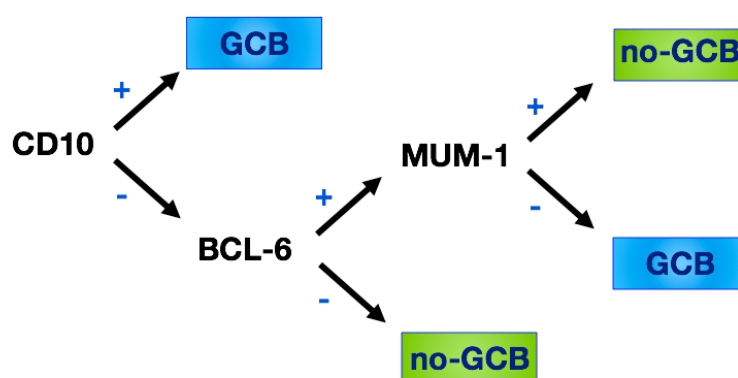


Figura 10. Algoritmo de Hans. GCB: germinal center B-cell.

Años más tarde, en 2009 se publicó un nuevo algoritmos para la determinación de la COO que utiliza GCET1, CD10, BCL-6, MUM1 y FOXP1 (figura 10), con una concordancia superior a la aportada por Hans, siendo en este caso del 87 % (Choi W *et*

al, 2009). De manera independiente del IPI, los subtipos GCB y no-GCB definidos por IHQ tuvieron diferencias significativas en SLE y SG en pacientes tratados con y sin rituximab, con una clara desventaja en términos de SG en el subtipo no-GCB (SG a 3 años, 87 % vs 44 % $p<0,001$).

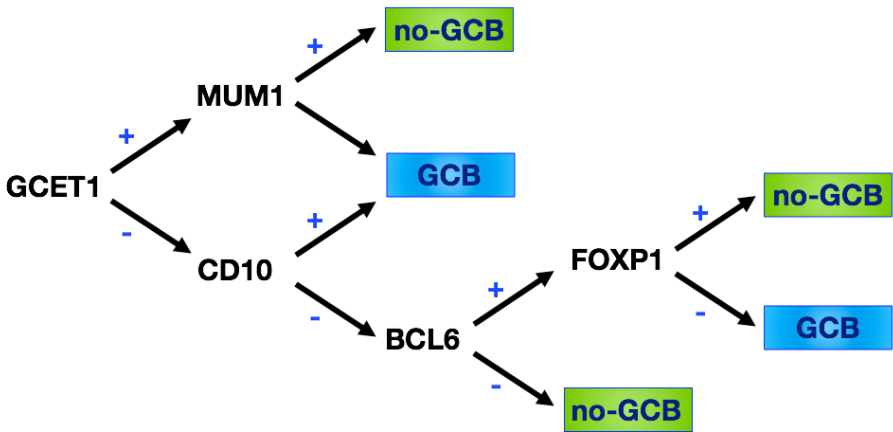


Figura 11. Algoritmo de Choi. GCB: germinal center B-cell.

Existen otros algoritmos desarrollados con el objetivo de mejorar los resultados de concordancia de los de Hans y de Choi; entre ellos destaca el algoritmo de Tally que usa GCET1 y CD10 como marcadores de GCB frente a MUM1 y FOXP1 como marcadores ABC aunque sin necesidad de realizarlos de forma secuencial (figura 10). En el caso de que la muestra presentase el mismo número de marcadores positivos que negativos, se planteaba el uso del anticuerpo anti-LMO2 como definitorio, ya que la positividad frente a este va a predecir un inmunofenotipo GCB. En el caso de este nuevo algoritmo, la concordancia en relación a estudios de microarrays es cercana al 93 % (Meyer PN *et al*, 2011).

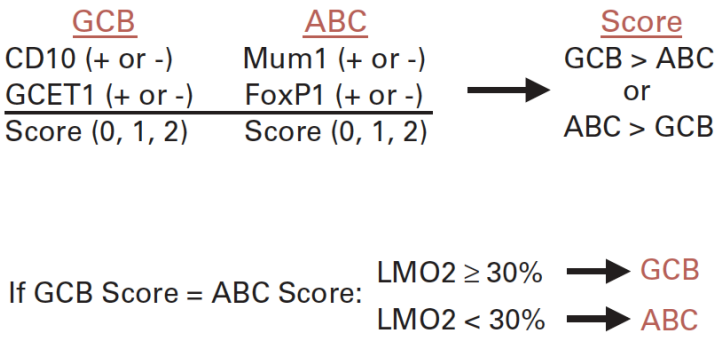


Figura 12. Algoritmo de Tally. GCB: germinal center B-cell; ABC: activated B-cell; 0: negativo; 1: Positivo. Tomado de J Clin Oncol. 2010;29:200-2007.

Si bien es cierto que la clasificación de la OMS de 2008 reconoció a los subgrupos moleculares de LDCGB basados en perfiles de expresión génica (ABC y GCB), considerando que estas técnicas no están disponibles en la práctica clínica habitual, esta subclasificación se consideró opcional. Sin embargo, la ampliación del conocimiento en estas líneas y los nuevos estudios de dianas terapéuticas y tratamientos ajustados a los subtipos moleculares del LDCGB, han hecho que uno de los cambios más importante en la nueva clasificación de la OMS 2017 sea que se acepte el uso de la IHQ para clasificar los casos (Swerdlow S *et al*, 2017).

Características citogenéticas y moleculares

La mayor parte de los LDCGB son producto de una expansión clonal del centro germinal de órganos linfoides periféricos, por lo cual más del 50 % de los casos muestran reordenamiento de genes de las cadenas pesadas y ligeras de las Ig, así como la SHM en las regiones variables. Pueden aparecer hipermutaciones somáticas aberrantes sobre múltiples loci genéticos, incluyendo los genes *PIMI*, *MYC*, *RhoH/TTF (ARFF)* y *PAX5* en torno al 50 % de las muestras, alteraciones genéticas podrían estar implicadas en la linfomagénesis del LDCGB. Las translocaciones cromosómicas más frecuentes en estos pacientes incluyen *BCL-6*, *BCL-2* y *MYC*. Aproximadamente el 70 % de los LDCG tienen mutaciones en *BCL-6*, las cuales se presentan con mayor frecuencia en los de origen ganglionar CD5+, CD30+ y en el primario esplénico, pero no en el mediastínico primario (Capello D *et al*, 2000). Estas mutaciones están asociadas a anomalías en la región 3q27 que incluye al gen *BCL-6*, la cual es la más común en pacientes con LDCGB. La sobreexpresión de *BCL-2* a pesar de que esta alteración es más frecuente en el LF, también puede encontrarse hasta en un 30 % de los pacientes con LDCGB y es a menudo el resultado de una translocación t(14;18) que coloca el gen *BCL-2* bajo el control de un promotor de inmunoglobulina. De igual forma, aunque la sobreexpresión de c-MYC es característica del linfoma de Burkitt también se han reportado entre el 5-15 % de los pacientes con LDCGB (Barrans S *et al*, 2010) y se asocia con mal pronóstico (Sáez AI *et al*, 2003; Stasik CJ *et al*, 2010). *MYC* es un factor de transcripción asociado con un amplio número de funciones celulares como el crecimiento y proliferación celular, angiogénesis, síntesis de proteínas, metabolismo y replicación del ADN y se destaca por su gran potencial oncogénico. A diferencia de en

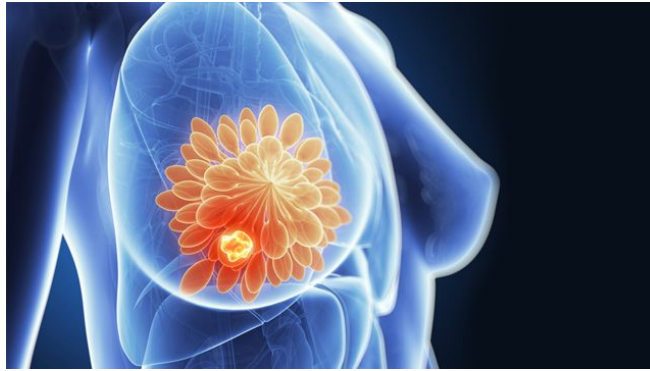
el linfoma Burkitt, los reordenamientos de *MYC* se encuentran como parte de un cariotipo complejo y normalmente representan eventos genéticos secundarios. La activación del gen *MYC* en LDCGB puede ocurrir debido a una translocación (5 % a 14 %), por aumento de las copias (19 % a 38 %), secundaria a una amplificación (2 %) o a una mutación (32 %) (Nowakowski y Czuczman, 2015). Sin embargo, en el caso de los pacientes con LDCGB la importancia de *MYC* está condicionada por la asociación con reordenamientos de *BCL-2* y/o *BCL-6*, casos en los que hablamos de linfomas “doble-hit” o “triple-hit”. Por tanto el verdadero impacto está en los pacientes en los que coexisten 2 o 3 de estas alteraciones a la vez, lo cual se refleja en una pobre SG a 12 meses en los tratados con esquemas como R-CHOP o similares. Es por esto que la nueva clasificación de la OMS propone una nueva categoría, la de linfomas de célula B de alto grado con reordenamiento de *MYC* y *BCL-2* y/o *BCL-6* (Petrich AM *et al*, 2014). La expresión de la proteína *MYC* se detecta en una mayor proporción de los LDCGB (30-50 %) y se asocia con la expresión concomitante de *BCL-2* en un 20 % a un 35 % de los casos. La mayoría de estos tumores no presentan alteraciones cromosómicas de *MYC/BCL2* y han sido nombrados con el término “linfoma doble expresor”. En la mayoría, pero no en todos los estudios, los linfomas con doble expresión presentan un peor pronóstico que otros LDCGB NOS pero éstos no son tan agresivos como los HGBL, con reordenamiento de *MYC* y *BCL-2* y/o *BCL-6* (Johnson NA *et al*, 2012). Sin embargo, la doble expresión de *MYC* y *BCL-2* además ha demostrado conferir un mayor riesgo de recaída en el SNC comparado con los no expresores independiente de la puntuación del índice pronóstico de recaída en SNC y de la COO (riesgo a 2 años, 9,7 % vs 2,2 %, P 0,001) (Savage KJ *et al*, 2016). Similares resultados se evidencian en un grupo de 117 pacientes recaídos / refractarios tratados con trasplante autólogo (44 % doble hit y 10 % doble expresores), que puso de manifiesto que para ambos casos la SLP fue inferior, mientras que el caso de la SG esta fue peor para los linfomas doble hit (SG a 4 años 25 % vs 61 % p 0.002) (Herrera AF *et al*, 2017). Estas observaciones han sugerido que la doble expresión de las proteínas *MYC* y *BCL-2* sin aberraciones genéticas deban ser consideradas como un factor pronóstico dentro de los LDCGB NOS, pero no una categoría separada.

Si analizamos las diferentes publicaciones podemos evidenciar que existen mutaciones somáticas comunes en ambos subtipos de LDCGB y son mutaciones inactivadoras de *TP53* y genes implicados en la inmunovigilancia (*B2M*, *CD58*), así como alteraciones en reguladores epigenéticos (*CREBBP/EP300*, *KMT2D*, *MEF2B*), y la activación

oncogénica de *BCL-6*. El subtipo ABC está asociado con la pérdida de 6q21, trisomía 3, y las ganancias de 3q y 18q21-22 (Bea S *et al*, 2005; Morin RD *et al*, 2010). El locus comúnmente suprimido en 6q incluye el gen para el supresor tumoral *PRDM1* cuya pérdida puede conducir a la inhibición de la diferenciación terminal del linfocito B y estar implicado en patogenia del LDCGB-ABC. Además, este subtipo se caracteriza por mutaciones en genes activadores de las vías del receptor de la célula B / receptores Toll-like (*MYD88*, *CD79A*, *CARD11*, *TNFAIP3*) y tiene un número alto de mutaciones somáticas en múltiples genes que son reguladores positivos de la vía NFκB, incluyendo *CARD11*, *TRAF2* y *TRAF5* (Compagno M *et al*, 2009). El LDCGB tipo III es un grupo heterogéneo de tumores que tienen perfiles de expresión génica que difieren del centro germinal y de las células B del centro post-germinal, siendo su patogenia desconocida. Aunque las implicaciones clínicas de estas mutaciones no han sido analizadas de forma completa, existe una gran expectativa en que presentarán un papel fundamental en guiar las terapias dirigidas futuras.

Pocos son los datos de los que disponemos con respecto a las alteraciones moleculares de los linfomas difusos de origen extraganglionares. La mayor parte de los datos vienen de estudios realizados en pacientes con linfoma cerebral primario, de los cuales esta histología representa cerca del 90 % de los casos (Montesinos-Rongen M *et al*, 2008) y del linfoma primario testicular. Sin embargo, solo existe una publicación hasta ahora de un análisis molecular del linfoma primario de mama, realizado en un grupo de pacientes en Japón, en el cual se analizó la frecuencia de mutaciones de *MYD88* y *CD79B* (Taniuchi K *et al*, 2016). Es por este escaso conocimiento en la biología del linfoma primario de la mama y de los linfomas extraganglionares en general que nos hemos visto motivados a realizar el estudio en esta población, para así contribuir a la comprensión de los eventos moleculares determinantes en la génesis y evolución de esta entidad.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



HIPÓTESIS

La incidencia del linfoma primario de la mama en España es similar en proporción y distribución por subtipos a la registrada en las grandes series internacionales publicadas y deberían existir factores clínicos y moleculares predictivos de la evolución de la enfermedad.

OBJETIVOS

El objetivo del proyecto de investigación es doble:

Describir las características clínicas de pacientes diagnosticados de linfoma primario de mama en España en el periodo comprendido entre 1980 y 2016, tratados en centros adscritos al Grupo Oncológico para el Tratamiento y Estudio de Linfomas (GOTEL).

Determinar las alteraciones moleculares implicadas en la linfomagénesis del linfoma difuso de célula grande B primario de mama (LDCGB-PM) y establecer su potencial pronóstico en la evolución de la enfermedad.

Objetivos secundarios:

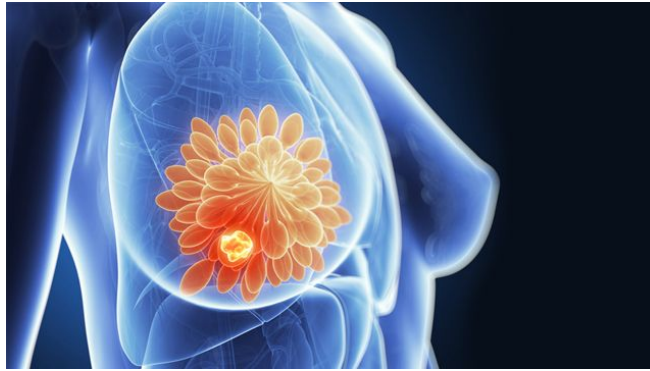
Describir los resultados de supervivencia tanto libre de progresión como global en la serie de pacientes con Linfoma primario de mama tratados por el Grupo Oncológico para el Tratamiento y Estudio de Linfomas.

Describir las frecuencias de presentación de mutaciones en los diferentes genes en el LDCGB-PM y compararlo con los datos publicados del LDCGB primario ganglionar.

Determinar las principales vías moleculares implicadas en la linfomagenesis del LDCGB-PM.

Contrastar los resultados del estudio molecular con las características clínicas de de cada paciente.

MATERIAL Y MÉTODOS



1. Diseño del estudio

Se ha llevado a cabo un estudio mixto que comprende una parte clínica que incluye el total de pacientes y una parte molecular dirigida al subgrupo de LDCGB-PM. La primera parte corresponde a un estudio de cohortes, multicéntrico y prospectivo en un grupo de 55 pacientes diagnosticados de linfoma primario de mama, tratados en 16 hospitales miembros del grupo Grupo Oncológico para Tratamiento y Estudio de Linfomas (GOTEL), el cual es un grupo cooperativo formado por una red de servicios médicos de Oncología de España, dentro de la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM). Esto ha garantizado la inclusión de una cantidad adecuada de pacientes, así como su seguimiento. Los pacientes fueron incluidos desde marzo de 1989 hasta enero de 2016, recogiendo los datos y centralizándose la recepción de muestras histológicas en el Hospital Universitario Puerta de Hierro de Majadahonda (HUPHM). El número de pacientes incluidos en el estudio molecular del grupo de pacientes con LDCGB-PM se amplió con casos aportados por los servicios de anatomía patológica del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla de Santander y Hospital MD Anderson Cancer Center de Madrid.

2. Población

La población de estudio fue de 55 pacientes diagnosticados de linfoma primario de la mama estadios I_E-II_E y con un seguimiento mínimo de 6 meses.

Criterios de inclusión

1. Pacientes con linfoma primario de mama estadios I_E-II_E con cualquier histología. Los pacientes con afectación mamaria bilateral se consideraron estadios II_E.
2. Registrado a lo largo del seguimiento y si hubo eventos relacionados (recaída o muerte).
3. Confirmación histológica de LPM siempre que se pudiese realizar.
4. Período mínimo de seguimiento de 6 meses desde el diagnóstico de LPM.
5. Pacientes que hayan firmado consentimiento de donación de tejido sobrante a los biobancos de cada hospital para estudio.

Criterios de exclusión

1. Pacientes con afectación secundaria de la mama por linfoma, es decir, pacientes con enfermedad sistémica o de otros órganos extraganglionares (estadios III_E-IV_E).
2. Pacientes que hayan denegado la de donación de tejido sobrante a los biobancos de cada hospital para estudio.

3. Definición de las variables

Pacientes y características clínicas

Se ha obtenido el consentimiento informado de los participantes tras una explicación de la naturaleza del estudio, según ha sido aprobado por los comités éticos de los hospitales. Las variables recogidas incluyen:

- Sexo.
- Edad.
- Fecha de diagnóstico de linfoma primario de mama.
- Tipo histológico.
- Localización (mama afecta).
- Presencia de afectación ganglionar axilar.
- Síntomas B.
- Índices pronósticos.
- Cirugía.
- Tipo de cirugía.
- Tratamiento de quimioterapia.
 - Esquema.
 - Número de ciclos.
 - Uso de antraciclinas.
 - Uso de rituximab.
- Tratamiento de radioterapia.
- Tipo de respuesta.

- Recaída.
- Patrón de recaída.
- Tratamiento a la recaída.
- Respuesta al tratamiento de la recaída.
- Situación clínica al cierre del estudio.
 - Vivo sin enfermedad.
 - Vivo con enfermedad.
 - Fallecido.
- Muerte
 - Causa (relacionada o no con la enfermedad).
 - Fecha de defunción.
- Fecha de última revisión.
- Hospital de procedencia.

Cuaderno de recogida de datos (CRD)

Los datos se recogieron en REDCap (Research Electronic Data Capture). Es una aplicación segura para crear y administrar bases de datos en línea, que nos permite seguir la inclusión de datos y exportarlos a paquetes estadísticos como el que posteriormente usamos para el análisis estadístico (Stata v14.1). Se recogieron variables demográficas, variables clínicas y analíticas, tratamientos administrados, tipo de respuesta y recaída con su correspondiente patrón, tratamiento y tipo de respuesta.

4. Seguimiento clínico y valoración de repuesta

Seguimiento prospectivo, empezando tras el diagnóstico y tratamiento, basado en visitas regulares con la periodicidad determinada a criterio del médico tratante, exámenes bioquímicos y radiológicos (TC de toraco-abdomino-pélvico, Mamografía, ecografía o RMN mamaria o PET-TC). La respuesta al tratamiento se determinó por criterios clínico-radiológicos siguiendo las guías de la International Workshop Response Criteria Guidelines. La respuesta completa (RC) se definió como la completa desaparición de lesiones radiológicas presentes al diagnóstico y ausencia de nuevas lesiones. La respuesta parcial (RP) fue definida como regresión de más del 50 % de las lesiones

medibles y ausencia de nuevas lesiones. Enfermedad estable (EE) se definió como menos del 50 % de regresión de lesiones medibles sin aparición de lesiones nuevas. Progresión se definió como aparición de nuevas lesiones o crecimiento en más del 25 % de cualquier lesión inicial. Los pacientes que alcanzaron una RC no confirmada sin evidencia de progresión de la enfermedad/recaída en los primeros 3 meses del seguimiento fueron registrados como RC.

Las variables de supervivencia se definieron así:

- La supervivencia libre de progresión se definió como el tiempo desde la entrada en el estudio hasta la progresión documentada del linfoma, recaída o muerte.
- La supervivencia global se definió como el tiempo desde la inclusión en el estudio hasta la última observación del paciente o muerte.

5. Diseño de recogida de datos

Se recogieron los datos clínicos de todos los pacientes diagnosticados de linfoma primario de la mama, que cumplieron todos los criterios de inclusión y ninguno de exclusión, tratados en hospitales miembros del grupo GOTEL. Se recogieron los datos de las historias clínicas con el fin de cumplimentar el Cuaderno de Recogida de Datos (CRD) diseñado a tal efecto (anexo I). Si existía material para confirmación del diagnóstico histológico y realización del estudio molecular, este se remitía a nuestro centro junto con el informe completo de anatomía patológica del hospital de procedencia con los datos codificados para cumplimentar la ley de protección de datos del paciente. Esta revisión histológica y confirmación del diagnóstico se realizó por parte patólogos expertos en linfomas del servicio de anatomía patológica del Instituto Valenciano de Oncología (IVO) quienes informaron datos sobre el tipo histológico, índice de proliferación, porcentaje de tumor en la muestra y la existencia o no de tejido mamario en la biopsia. En los casos de recaída que tenían confirmación histológica, se solicitó la muestra del diagnóstico y de la recaída.

6. Desarrollo del estudio

El estudio se desarrolló en tres fases:

Fase I: Recogida de datos de todos los pacientes con linfoma primario de la mama y análisis de los datos clínicos.

Fase II: Revisión centralizada y confirmación del diagnóstico histológico.

Fase III: Secuenciación masiva de las muestras de pacientes con subtipo histológico linfoma difuso de célula grande B.

7. Análisis estadístico

Análisis descriptivo

En nuestro estudio, para la descripción de variables numéricas hemos utilizado la media junto a la desviación estándar o la mediana y percentiles 25 y 75, según cumplimiento de la asunción de normalidad. Con respecto a las variables cualitativas, estas se describen mediante frecuencias absolutas y relativas.

Análisis de supervivencia

Se ha evaluado la SG, definida como la muerte por todas las causas para toda la muestra definiendo el momento inicial como la fecha del diagnóstico del LPM, y el momento final como la fecha del exitus, fecha de la última visita de seguimiento o mayo de 2016 para los pacientes que siguen vivos hasta esa fecha y de los que se dispone de dicha información. En ninguno de los casos hubo pérdida de seguimiento por lo que no hubo necesidad de censurar casos. La evaluación de la SLP se realizó teniendo como momento inicial el diagnóstico de LPM y la fecha final la aparición de evento determinado por la progresión o recaída de la enfermedad. La estimación de las curvas de supervivencia se ha llevado a cabo con el método de Kaplan-Meier.

Se realizó el análisis de supervivencia tanto global como libre de progresión de forma específica discriminando grupos según el estadio de la enfermedad, uso de antraciclinas, tratamientos con rituximab y grupos de edad (menores de 40 años, entre 40 y 60 años y finalmente los mayores de 60 años). El análisis de sensibilidad se ha llevado a cabo en la muestra de pacientes, descartando los estadios III_E-IV_E. En primer lugar, se ha

realizado una comparación de las características de los pacientes al momento del diagnóstico y a la recaída y se han estimado las curvas de Kaplan-Meier según diferentes tratamientos administrados a estos pacientes, y se han comparado con la prueba de log-rank.

El nivel de significación se ha establecido en 0,05 para todos los contrastes. El software estadístico utilizado ha sido Stata v14.1 (StataCorp. 2015. Stata Statistical Software: Release 14. College Station, TX: StataCorp LP.).

8. Aspectos éticos

Previo al inicio del estudio, este ha sido sometido a evaluación por parte del Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del HUPHM (anexo II), para cumplir así con las directrices establecidas sobre estudios observacionales. Las pruebas moleculares se han realizado sobre muestras biológicas tomadas como parte del diagnóstico inicial de la enfermedad y por tanto no implicó la realización de nuevos procedimientos invasivos en los sujetos participantes en el estudio.

Se ha elaborado un formulario de consentimiento informado (anexo III) que se ha pasado a los pacientes incluidos. La colección y manejo de muestras ha seguido las indicaciones establecidas en la Ley 14/2007, de 3 de julio, de investigación biomédica. Solo los investigadores conocen el único dato que puede identificar a los pacientes y que se corresponde con el número de historia clínica, el cual ha sido separado del resto de criterios introducidos en la base de datos del estudio. El paciente ha sido identificado mediante un código numérico (ej. 01, 02, 03, etc.) con la finalidad de respetar la confidencialidad de los datos personales de los pacientes, según establece la Ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos de Carácter Personal.

9. Análisis moleculares

El centro de referencia de recepción de muestras biológicas tumorales de tejido parafinado fue el laboratorio de investigación en Linfomas del servicio de Oncología Médica del Instituto de Investigación Sanitaria (IIS) del HUPHM. Posteriormente se

enviaron laminillas de hematoxilina eosina y el bloque parafinado al servicio de anatomía patológica del Instituto Valenciano de Oncología (IVO) para la revisión histológica y confirmación diagnóstica. Una vez finalizado el proceso fueron devueltas al laboratorio de investigación en linfomas para el estudio de secuenciación masiva.

Características de las muestras

Las muestras corresponden a las biopsia o bloques de piezas quirúrgicas extraída para el diagnóstico inicial de la enfermedad. Se recibieron en total 30 muestras de LDCGB-PM tomadas al momento del diagnóstico y un caso con la correspondiente biopsia de la recaída.

Secuenciación masiva

El desarrollo de nuevas técnicas de secuenciación masiva o ultrasecuenciación ha permitido no solo la identificación de mutaciones no descritas previamente, sino la identificación de mutaciones en poblaciones celulares que están presentes en baja proporción. Específicamente para el cáncer, la ultrasecuenciación permite identificar mutaciones en estados neoplásicos precoces en los cuales la presencia de la mutación no está presente en el 40 % de las células (frecuencia alélica 20 %) necesario para la detección por técnicas clásicas de secuenciación (Sanger). Esta nueva tecnología ya ha sido utilizada con éxito en muchos estudios. Esto es importante en tumores como los linfomas, que pueden tener una proporción variable de células no tumorales en las biopsias ganglionares. Esta técnica lo que permite es secuenciar una región genómica cientos o incluso miles de veces. Es especialmente útil para estudios en oncología donde requerimos una secuenciación más “profunda” para identificar las mutaciones dentro de los tumores debido a la contaminación que pueden producir las células normales acompañantes, además de que los propios tumores pueden contener múltiples subclones.

Técnica de secuenciación

Tras realizar un exhaustivo análisis los datos publicados previamente de secuenciación masiva en series de linfomas agresivos ganglionares, se seleccionó un panel de 38 genes mutados recurrentemente y se diseñó un panel panel TruSeq® Custom Amplicon low input (dual strand protocol) de Illumina (tabla 7). Este kit permite secuenciar cientos de regiones genómicas alcanzando un alto rendimiento con cantidades muy pequeñas, incluso menores de 50 ng de ADN. Además, la secuenciación de doble cadena tiene la ventaja de que elimina los falsos positivos en mutaciones C-T que pueden surgir de la desaminación durante la fijación de formalina. Las sondas de este panel personalizado han sido diseñadas con DesignStudio (Illumina) y consta de 1399 amplicones con un tamaño medio de 175 pb y una región de destino acumulada de 140 kb. Se evitaron los polimorfismos en el diseño de los cebadores.

TruSeq Custom Panel		
<i>ARID1A</i>	<i>CXCR4</i>	<i>PLCG2</i>
<i>ATM</i>	<i>EP300</i>	<i>PRDM1/BLIMP1</i>
<i>ATP6AP1</i>	<i>EZH2</i>	<i>PTPN1</i>
<i>ATP6UIB2</i>	<i>FAT2</i>	<i>RRAGC</i>
<i>B2M</i>	<i>FOXO1</i>	<i>SGK1</i>
<i>BCL2</i>	<i>ID3</i>	<i>SMARCA4</i>
<i>BRAF</i>	<i>MEF2B</i>	<i>STAT3</i>
<i>BTK</i>	<i>MLL2/KMT2D</i>	<i>STAT6</i>
<i>CARD11</i>	<i>MYC</i>	<i>TCF3</i>
<i>CCND3</i>	<i>MYD88</i>	<i>TNFAIP3/A20</i>
<i>CD79A</i>	<i>NOTCH1</i>	<i>TNFRS</i>
<i>CD79B</i>	<i>NOTCH2</i>	<i>TP53</i>
<i>CREBBP</i>	<i>PIM1</i>	-

Tabla 7. Panel de 38 genes utilizado para el estudio de secuenciación masiva en linfoma primario de mama

La **extracción del ADN genómico** de las muestras parafinadas (*formalin fixed and paraffin embedded tissues* - FFPE) se realizó con el kit truXTRACT FFPE (Covaris, Woburn MA EE.UU.) con el sonicador Covaris S220 o M220 en colaboración con la unidad de Genómica del Centro Nacional de Investigación Oncológica (CNIO). El kit truXTRACT FFPE DNA está diseñado para la extracción controlada y eficiente de ADN de muestras FFPE a través del uso de acústica focalizada (en inglés *Adaptive Focused Acoustics* - AFA). AFA permite la eliminación activa de parafina del tejido FFPE y la rehidratación simultánea de todo el tejido mejorando así la digestión tisular por la proteinasa K y potenciando la disociación de las biomoléculas para una mejor extracción de ADN. Además, el proceso AFA permite el uso de cortes más gruesos, siendo recomendado un grosor entre 15 and 25 μm lo cual puede aumentar el rendimiento y minimizar el impacto de degradación de algunas zonas expuestas. Así pues, el proceso truXTRACT da como resultado muestras de ADN de calidad, adecuados para los métodos analíticos ultrasensibles como la secuenciación masiva.

Por tanto, el primero paso es el depósito de los cortes de parafina en los microTUBE Screw-Cap diseñados para llevar a cabo el proceso, añadiendo 100 μl del Buffer SDS y cerrando el microTUBE con la tapa de seguridad. Posteriormente la muestra se coloca en el sonicador Covaris S220 a 20°C durante el tiempo indicado en las instrucciones, lo cual a través de ondas de ultrasonido logra permite la emulsión de la muestra (figura 12).

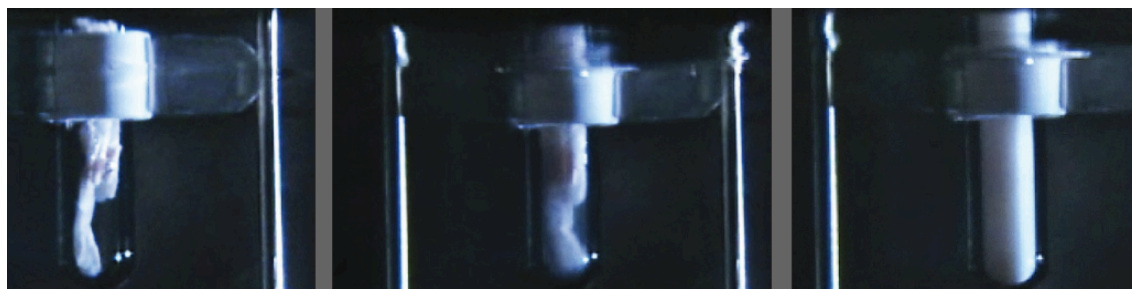


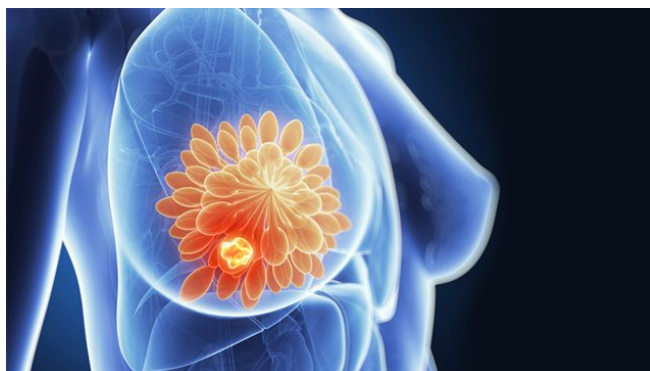
Figura 13. Proceso de emulsificación de la muestra en el microTUBE Screw-Cap, mediante la tecnología AFA de Covaris.

Una vez emulsificada la muestra, se añade al microTUBE 20 μl de solución de proteinasa K y se somete nuevamente a sonificación según las indicaciones del protocolo truXTRACT. Posteriormente, la muestra se deja a 56°C durante toda la noche, para permitir la digestión por la proteinasa K en el termostato de bloque seco (Biosan) para finalmente proceder a la purificación de la muestra y recolección del ADN.

El **enriquecimiento del ADN de los genes de interés** se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Illumina, CA, USA). La cantidad total de ADN extraído por muestra varió entre 30 a 100 ng. Después de la preparación de las librerías, la indexación y la purificación con esferas, se cuantificaron con Qubit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.). Se prepararon y cuantificaron dos librerías por cada muestra, al ser una librería por hebra, para posteriormente preparar la secuenciación. El pool de librerías es cargada en una celda de flujo MiSeq Reagent Kit v2 (emparejado, 2x151) de Illumina (Illumina, CA, USA), como se describe en el protocolo del fabricante. La cobertura media por amplicón para el pool A fue 379x (50-1098x) y para el pool B de 426x (30-2149x). El proceso de secuenciación se inicia y cada pool se digitaliza con combinaciones de LED y filtros específicos de cada uno de los cuatro dideoxinucleótidos marcados con tinta luminiscente. Después del análisis de imágenes, el software realiza un análisis principal, que incluye la búsqueda de bases, el filtrado y la puntuación de calidad. Una vez finalizado todo el proceso, el software de análisis MiSeq Reporter inicia automáticamente un análisis secundario, que incluye la alineación y la identificación de variantes. La secuenciación y análisis de las muestras se realizó en la Unidad de Secuenciación de ADN y Biología Molecular del IIS Puerta de Hierro.

Además, se realizó un segundo análisis independiente con VarScan 2.4.0 y Annovar para las variantes de un solo nucleótico (Wang K *et al*, 2010). Todas las variantes identificadas por ambos métodos complementarios se visualizaron utilizando la Integrative Genome Viewer - IGV (Robinson JT *et al*, 2011) y sólo se consideraron válidas las mutaciones detectadas tanto en el pool A como en el pool B.

RESULTADOS



Uno de los propósitos del estudio es realizar una exhaustiva descripción de la población de pacientes afectos por linfoma primario de la mama en España, las características clínicas y evolutivas, así como la descripción de los eventos moleculares relacionados con la linfomagénesis del subtipo linfoma difuso de células grandes B.

1. Características de la serie de pacientes con linfoma primario de mama en España.

Descripción clínica general

Nuestro trabajo ha permitido realizar un análisis prospectivo de datos clínicos de pacientes diagnosticados entre marzo de 1989 y enero de 2016 de linfoma primario de la mama y tratados en hospitales cuyos servicios de Oncología Médica están adscritos al grupo GOTEL y otros centros colaboradores. Tras la recogida de datos y un análisis inicial, se recopiló información de 60 casos de linfomas con afectación de la mama. Del total de 60 casos, se excluyeron 5 de ellos, 3 casos por no cumplir criterios clínicos al ser considerados linfomas estadios IV con afectación sistémica y en órganos extraganglionares diferentes además de la mama y 2 casos se excluyeron por no haber datos clínicos de tratamiento y/o seguimiento (figura 13).

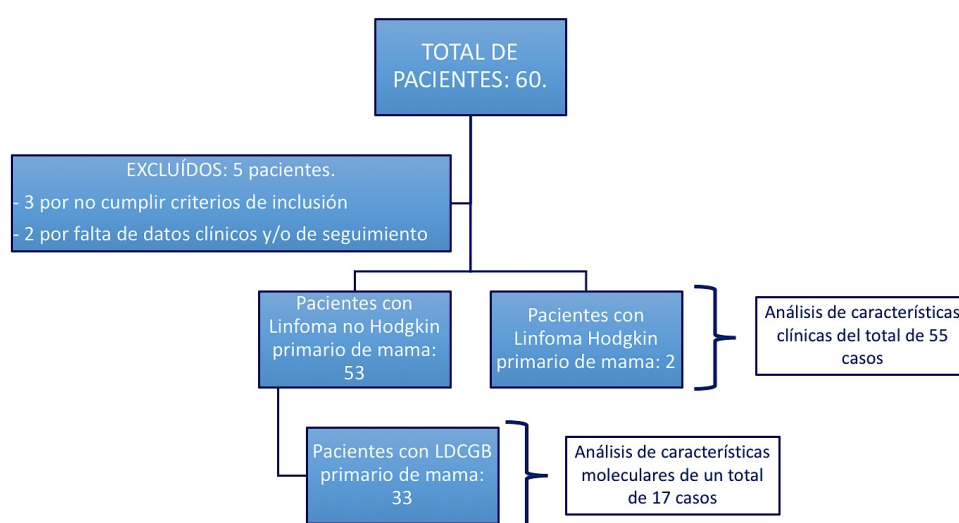


Figura 14. Diseño general del estudio de Linfoma primario de mama.

Linfoma Primario de la Mama

Si tenemos en cuenta que los servicios oncológicos pertenecientes al grupo GOTEL se encuentran dispersos a lo largo de la geografía española, consideramos que la muestra a pesar de ser pequeña, es representativa de la población. La distribución de porcentaje de casos por centro se encuentra detallada en la tabla 7.

CENTRO	PROVINCIA	Nº	% del total
Instituto Valenciano de Oncología	Valencia	10	18 %
Hospital Universitario Puerta de Hierro	Madrid	7	13 %
Hospital Universitario de Gran Canaria Dr Negrin	Las Palmas	7	13 %
Hospital Universitari Sant Joan de Reus	Tarragona	5	9 %
Hospital Universitario Virgen de la Salud	Toledo	4	7 %
Hospital de la Serranía de Ronda	Málaga	4	7 %
Hospital Universitario de Canarias	Las Palmas	3	5 %
Hospital Universitario Insular de Gran Canaria	Las Palmas	3	5 %
Hospital Universitari i Politècnic La Fe	Valencia	3	5 %
Hospital Universitario de Elche	Alicante	2	4 %
Complejo Hospitalario de Pontevedra	Pontevedra	2	4 %
Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca	Murcia	1	2 %
Hospital Universitario Virgen de la Macarena	Sevilla	1	2 %
Hospital Universitario Virgen de la Victoria	Málaga	1	2 %
Hospital Universitario San Cecilio	Granada	1	2 %
Instituto Oncológico de Kutxa	Guipúzcoa	1	2 %
Total	España	55	100 %

Tabla 7. Distribución de casos de linfoma primario de mama en España por centro y provincia.

De los 55 casos de LPM, la distribución por sexo fue de 53 casos en mujeres y 2 casos en varones, 96,4 % y 3,6 % respectivamente, con una edad media de presentación de la enfermedad de 69 años, con un rango entre los 29 y 86 años. El 96,4 % de los casos correspondían a LNH, cuya distribución se detalla en la figura 14 y solo dos de los casos eran LH (3,6 % del total), uno de ellos tipo esclerosis nodular y el otro rico en linfocitos.

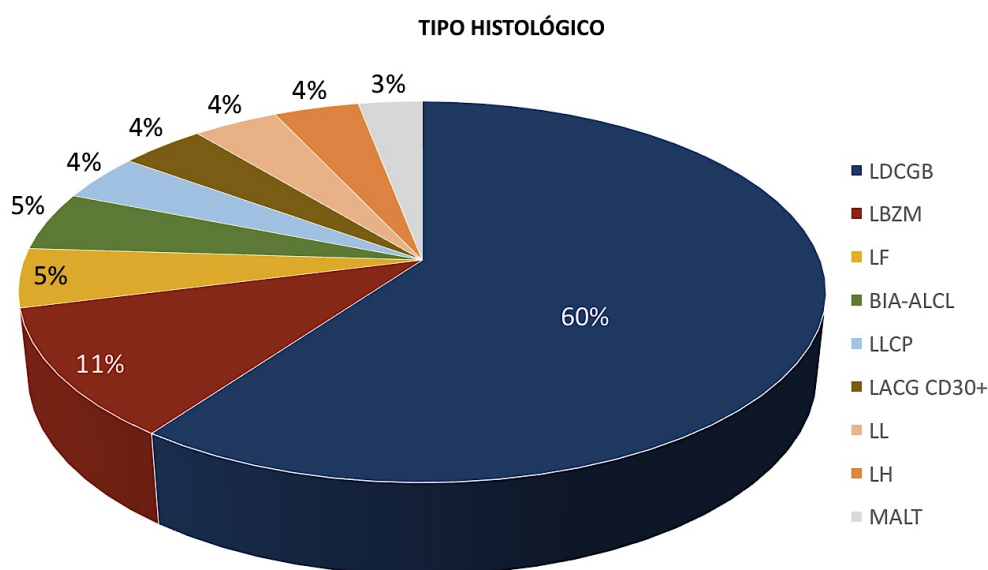


Figura 15. Distribución los casos de Linfoma primario de mama por tipo histológico. LDCGB: Linfoma difuso de célula grande B; LBZM: Linfoma B de la zona marginal; LF: Linfoma folicular; BIA-ALCL: Linfoma asociado a prótesis (en inglés, Breast Implant-Associated Anaplastic Large Cell Lymphoma; LLCPP: Linfoma linfocítico de célula pequeña; LACG CD30+: Linfoma anaplásico de célula grande CD30+; LL: Linfoma linfocítico; LH: Linfoma de Hodgkin; MALT: Linfoma de tejido linfoide asociado a mucosa.

Con respecto a la afectación anatómica del LPM en la serie analizada, el 52,7 % presentó afectación de la mama derecha, el 40 % la mama izquierda y solo el 7,27 % presentaron afectación bilateral glandular mamaria. El 36,4 % de los pacientes tenían afectación ganglionar axilar. Siguiendo los criterios de estadificación de Ann-Arbor y considerando los casos de afectación bilateral mamaria como estadio II_E, se pudo establecer que el 58,2 % de los casos correspondieron a estadios I_E mientras que el 41,8 % restante eran estadios II_E y que solo dos pacientes presentaron síntomas B en algún momento de la enfermedad. En la tabla 8 se encuentra recopilada la información correspondiente a las características clínicas de los pacientes con LNH, de los cuales el

70 % estaba representado por histologías agresivas y 30 % eran linfomas de comportamiento indolente.

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA COHORTE DE PACIENTES CON LNH-PM			
CARACTERÍSTICAS	TOTAL DE CASOS N° (%)	INDOLENTES N° (%)	AGRESIVOS N° (%)
TOTAL	53 (100 %)	16 (30 %)	37 (70 %)
EDAD			
< 40 AÑOS	9 (17 %)	2 (12,5 %)	7 (19 %)
41-60 AÑOS	19 (35,8 %)	6 (37,5 %)	13 (35 %)
> 60 AÑOS	25 (47 %)	8 (50 %)	17 (46 %)
SEXO			
MUJER	51 (98 %)	16 (100 %)	36 (97,2 %)
HOMBRE	1 (2 %)	0 (0 %)	1 (2,7 %)
ADENOPATÍAS			
SI	27 (45,3 %)	8 (50 %)	16 (43,5 %)
NO	29 (54,7 %)	8 (50 %)	21 (56,5 %)
LATERALIDAD			
DERECHA	28 (52,8 %)	9 (56,25 %)	18 (48,6 %)
IZQUIERDA	21 (39,6 %)	5 (31,25 %)	17 (46 %)
BILATERAL	4 (7,5 %)	2 (12,5 %)	2 (5,4 %)
ESTADIO			
I _E	33 (62,2 %)	8 (50 %)	25 (67,5 %)
II _E	20 (37,7 %)	8 (50 %)	12 (32,4 %)
SÍNTOMAS B			
SI	2 (3,7 %)	0 (0 %)	2 (5,4 %)
NO	51 (96,2 %)	100 (100 %)	35 (94,6 %)

Tabla 8. Características clínicas de los pacientes con LNH-PM, según la agresividad del linfoma (agresivo vs indolente). LNH-PM: Linfoma no Hodgkin primario de mama.

Con respecto a los tipos de tratamientos utilizados en el manejo de estos pacientes está la cirugía, la quimioterapia y la radioterapia, solas o en combinación. Los dos casos de pacientes con linfoma de Hodgkin se trataron con quimioterapia con esquema ABVD,

requiriendo uno de ellos previamente cirugía tipo tumorectomía para determinar el tipo histológico de la neoplasia que radiológicamente era maligna e indistinguible de un cáncer de mama de tipo epitelial. Solo un paciente con histología indolente (linfoma folicular) se mantuvo en observación sin llegarse a evidenciar progresión de la enfermedad al momento del cierre y análisis del estudio, cuando habían transcurrido 24 meses desde el diagnóstico. La descripción general de los tipos de tratamientos empleados en el grupo de pacientes con LNH-PM se detalla en la tabla 9.

TIPOS DE TRATAMIENTO EN PACIENTES CON LNH-PM			
TIPO DE TRATAMIENTO	TOTAL DE CASOS N° (%)	INDOLENTES N° (%)	AGRESIVOS N° (%)
TOTAL	53 (100 %)	16 (30,18 %)	37 (69,8 %)
OBSERVACIÓN	1 (1,8 %)	1 (6,25 %)	0 (0 %)
CIRUGÍA SOLA	5 (9,43 %)	4 (25 %)	1 (2,7 %)
RT SOLA	2 (3,8 %)	2 (12,5 %)	0 (0 %)
QT SOLA	17 (32 %)	4 (25 %)	13 (31 %)
CIRUGÍA MÁS QT	9 (17 %)	2 (12,5 %)	7 (19 %)
QT / RT	12 (22,6 %)	1 (6,25 %)	11 (30 %)
CIRUGÍA / QT / RT	6 (11,3 %)	1 (6,25 %)	5 (13,5 %)
RITUXIMAB	39 (73,6 %)	8 (50 %)	31 (84 %)

Tabla 9. Tipos de tratamiento en pacientes con LNH-PM, según la agresividad del linfoma (agresivo vs indolente). LNH-PM: Linfoma no Hodgkin primario de mama; RT: Radioterapia; QT: Quimioterapia.

Los pacientes intervenidos quirúrgicamente fueron un total de 21, es decir, el 38,2 % del total. El procedimiento más frecuentemente realizado fue la tumorectomía en el 60 % de las intervenciones, seguido de la mastectomía simple (25 %) y 3 casos de reemplazo de prótesis y/o capsulectomía (15 %). Estos últimos 3 casos corresponden a pacientes con diagnóstico de BIA-ALCL, de los cuales sólo un paciente recibió posteriormente tratamiento de quimioterapia con esquema CHOP. Un total de 36,4 % de los pacientes fueron tratados con radioterapia sola o en combinación con otros tratamientos. Más concretamente, sólo 2 pacientes fueron tratados con radioterapia exclusiva y eran linfomas indolentes que entraron en remisión completa radiológica y

sin datos de recaída documentada al momento del cierre del estudio y análisis de los datos. De 45 pacientes con LNH que fueron tratados con quimioterapia, 38 recibieron rituximab (84,4 %). Los 7 casos restantes no recibieron el anti-CD20 dado que eran pacientes diagnosticados en la era pre-rituximab (2 casos) o bien eran linfomas T (5 casos). Igualmente, de estos 45 pacientes, el 77,5 % recibieron antraciclinas como parte de los esquemas de quimioterapia, los cuales se detallan en la tabla 10. Del total de los 18 pacientes tratados con QT de forma exclusiva, 17 correspondían a casos de LNH y uno de LH. El 80 % de los pacientes tratados con QT recibieron entre 4-6 ciclos.

ESQUEMAS DE QT USADOS EN EL MANEJO DEL LPM		
RÉGIMEN DE QT	Nº	%
R-CHOP	29	62 %
CHOP	5	11 %
R-CVP	4	8,5 %
CVP	2	4,25 %
R SOLO	2	4,25 %
ABVD	2	4,25 %
R-COMP	1	2 %
R-MVP	1	2 %
R-BACOP	1	2 %

Tabla 10. Esquemas de QT usados en el manejo del LPM. QT: Quimioterapia; LPM: Linfoma primario de mama; ABVD: Doxorubicina, bleomicina, vinblastina, dacarbazina; CHOP: Ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, prednisolona; COMP: Ciclofosfamida, doxorubicina liposomal, vincristina, prednisolona; CVP: Ciclofosfamida, doxvancristina, prednisolona; BACOP: Bleomicina, epidoxorubicina, ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, prednisolona; MVP: Mitomicina, vinblastina, cisplatino; R: Rituximab.

En términos de respuesta al tratamiento inicial, el 86,7 % de pacientes alcanzaron respuesta completa, 5,4 % fueron respuestas parciales, 3,7 % estabilización de la enfermedad y 3,7 % fueron progresión de la enfermedad. De las dos pacientes progresadas a primera línea de QT, un caso correspondía a un LDCGB y otro a BIA-ALCL; este último recae tras cuatro ciclos de CHOP y muere a causa de la enfermedad. En la tabla 11 se describen los tipos de respuesta al tratamiento de primera línea en casos de LNH-PM y el porcentaje de cada uno, tras realizar un análisis global y diferenciado según los subtipos histológicos agresivos frente a los indolentes. Este análisis demuestra una mayor tasa de respuestas completas en pacientes con linfoma agresivo en comparación con los linfomas indolentes. Los dos casos correspondientes a LH alcanzaron RC.

TIPOS DE RESPUESTA AL TRATAMIENTO DE 1ª LÍNEA EN LNH-PM			
TIPO DE RESPUESTA	TOTAL (53)	INDOLENTES (16)	AGRESIVOS (37)
COMPLETA	46 (87 %)	12 (75 %)	34 (92 %)
PARCIAL	3 (6 %)	1 (6,25 %)	2 (5,4 %)
ESTABILIDAD	2 (3,5 %)	2 (12,5 %)	0 (0 %)
PROGRESIÓN	2 (3,5 %)	1 (6,25 %)	1 (2,7 %)

Tabla 11. Tipos de respuesta a la primera línea de tratamiento. LNH-PM: Linfoma no Hodgkin primario de mama.

Al momento del cierre del estudio se documentaron un total de 10 recaídas de la enfermedad (tabla 12), todas ellas correspondientes a linfomas de alto grado. De estas, 9 recibieron tratamiento de segunda línea de QT alcanzando RC en el 50 % de los casos, 40 % progresaron y murieron por causa de la enfermedad y 10 % de estabilidad de la enfermedad con posterior progresión y muerte por la misma causa. La paciente que no recibió tratamiento de 2ª línea de QT corresponde a un caso de LDCGB en mal estado funcional, lo que impidió la administración de tratamiento de rescate.

PATRÓN DE RECAÍDA DEL LPM				
HISTOLOGÍA	LOCALIZACIÓN	TRATAMIENTO	RESPUESTA	SITUACIÓN
LL	GANGLIONAR	CHOP	PR	MPE
LDCGB	GANGLIONAR	R-CVP	PR	MPE
LDCGB	GANGLIONAR	ND	PR	MPE
LDCGB	LOCAL	R-GDP	RC	VSE
LDCGB	LOCAL	R-ESHAP	RP	MPE
LACG CD30+	PULMONAR	ESHAP	RC	VSE
LDCGB	CONTRALATERAL	R-COMP	RC	VSE
LDCGB	CONTRALATERAL	R-ESHAP	RC	VSE
LDCGB	CEREBRAL	MTX	PR	MPE
LDCGB	CEREBRAL	MTX	PR	MPE

Tabla 12. Patrón de recaída del linfoma primario de mama. LL: Linfoma linfoblástico; LDCGB: Linfoma difuso de célula grande B; ALCL: Linfoma anaplásico de célula grande; RC: Respuesta completa; RP: Respuesta parcial; PR: Progresión; CHOP: Ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, prednisolona; COMP: Ciclofosfamida, doxorubicina liposomal, vincristina, prednisolona; CVP: Ciclofosfamida, doxvincristina, prednisolona; R: Rituximab; MTX: Metotrexate; VSE: Vivo sin enfermedad; MPE: Muerto por enfermedad.

2. Análisis de supervivencia

El análisis realizado sobre el grupo de pacientes con LNH-PM con una mediana de seguimiento de 4,7 años al momento del cierre del estudio mostró una SG del 80 % a los 3 años, 76 % a los 5 años y 71 % a los 10 años (Figura 15) y una SLP de 78 %, 73 % y 64 % a los 3, 5 y 10 años respectivamente (Figura 16).

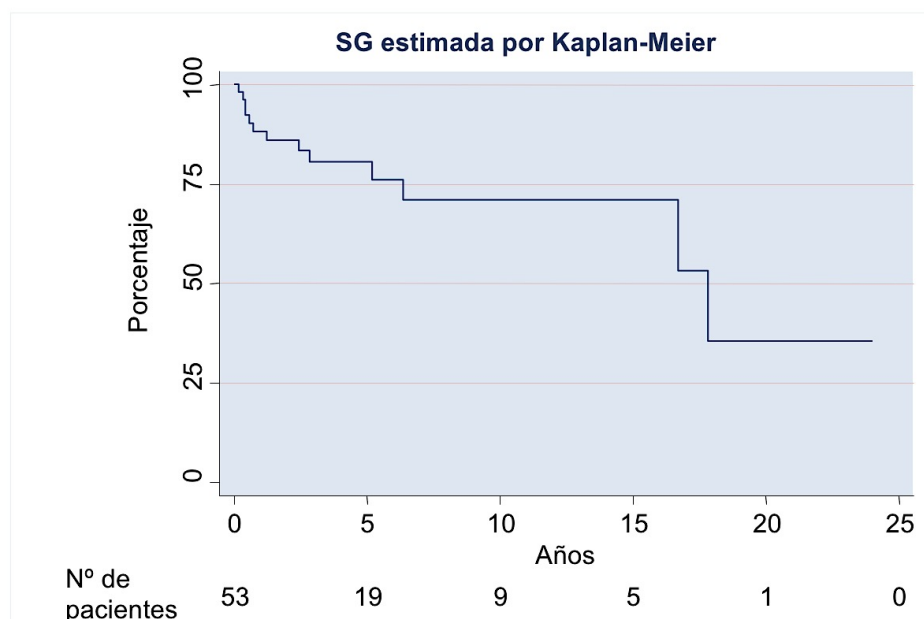


Figura 16. Curvas de supervivencia global (Kaplan Meier). SG: Supervivencia global.

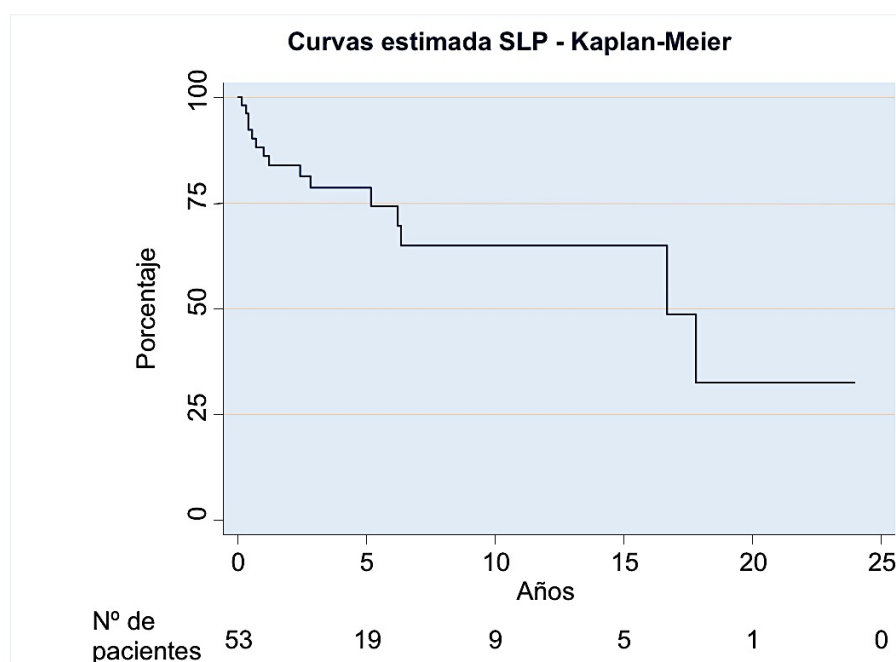


Figura 17. Curvas de supervivencia libre de progresión (Kaplan Meier). SLP: Supervivencia libre de progresión.

Los datos correspondientes al análisis de supervivencia tanto global como libre de enfermedad se muestran de forma detallada en la tabla 13.

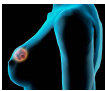
ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA POR ESTADIOS DE LA ENFERMEDAD						
 ESTADIO I_E	SG (P= 0.35)			SLP (P= 0.14)		
	3 años	5 años	10 años	3 años	5 años	10 años
ESTADIO I_E	85 %	78 %	78 %	80 %	78 %	78 %
ESTADIO II_E	73,5 %	73,5 %	57,2 %	68,5 %	68,5 %	42 %

Tabla 13. Análisis estadístico de supervivencia por estadios del linfoma primario de mama. SG: Supervivencia global; SLP: Supervivencia libre de progresión.

El análisis según el tratamiento recibido muestra una tendencia a la mejoría en términos de supervivencia global en los pacientes que recibieron antraciclinas frente a los que no las recibieron, siendo esta a los 3 años de 81.7 % frente a 61.2 % y a 5 años de 76,6 % frente a 61 % aunque no se alcanzó la significancia estadística ($P = 0,23$). Del mismo modo, la SLP varió dependiendo de si los pacientes recibieron antraciclinas o no (figura 17), siendo esta de 81.7 % frente a 61.2 % a los 3 años y de 76.6 % frente a 61 % a los 5 años, siendo en este caso estadísticamente significativa ($P= 0.05$).

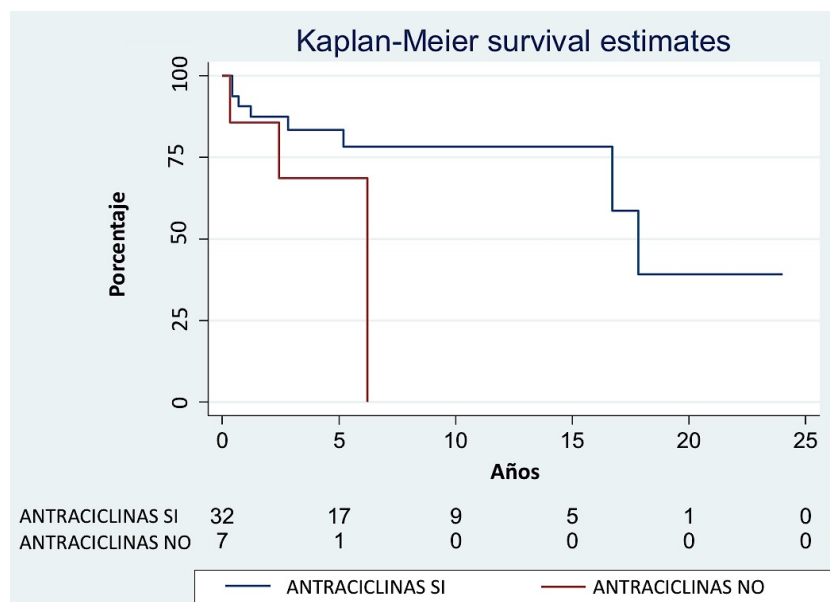


Figura 18. Curvas de supervivencia libre de progresión (Kaplan Meier) en función de la adición o no de antraciclinas al esquema de QT utilizado. SLP: Supervivencia libre de progresión; QT: Quimioterapia.

En el caso de la inmunoterapia, es decir, el uso o no de R en el esquema de tratamiento, no se observaron diferencias significativas en términos de SLP ni SG. En este caso, tanto la SG en los pacientes que recibieron R a 3 años fue de 81,6 % y 75 % a los 5 años frente al 62,5 % a los 3 años en el grupo de pacientes que no recibieron la inmunoterapia. La SLP en el grupo de pacientes tratados con R fue de 82 % a los 3 años, de 75 % a los 5 años y 67,35 % a los 10 años, mientras que en el grupo que no lo recibió fue de 62,5 % a los 5 años, sin encontrarse diferencias estadísticamente significativas. De igual forma, hemos analizado los diferentes grupos por grupos de edad, dividiéndolos en pacientes menores de 40 años, pacientes de 41 a 60 años y finalmente pacientes mayores de 60 años, sin observarse diferencias significativas en SG ni en SL (Tabla 14 y Figura 18).

SUPERVIVENCIA A 5 AÑOS DEL LPM SEGÚN GRUPOS DE EDAD		
	SG	SLP
< 40 AÑOS	76,5 %	76,5 %
41-60 AÑOS	83 %	83 %
> 60 AÑOS	72 %	69 %

Tabla 14. Análisis estadístico de supervivencia por grupos de edad del linfoma primario de mama. SG: Supervivencia global; SLP: Supervivencia libre de progresión.

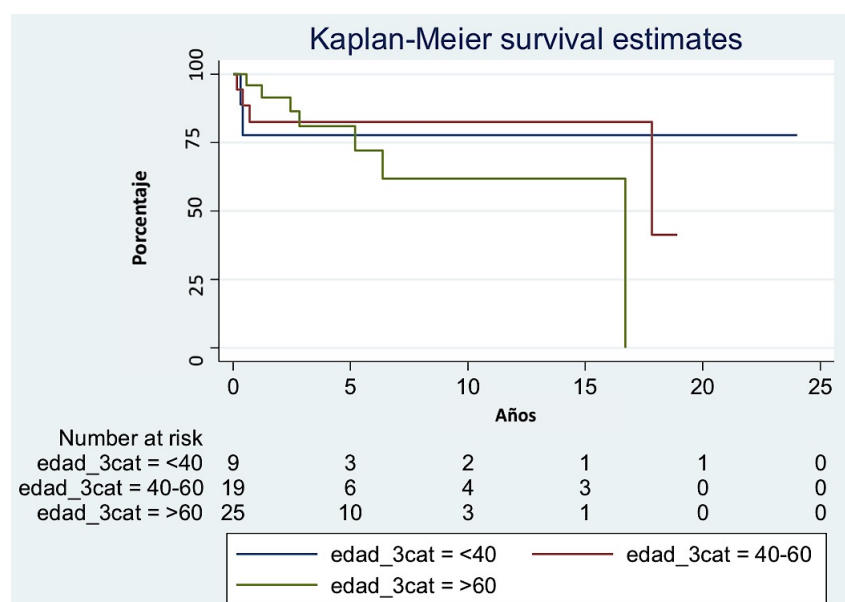


Figura 19. Curvas de supervivencia global en pacientes por grupos de edad del linfoma primario de mama.

Finalmente, el análisis de supervivencia basado en la agresividad del tumor tampoco muestra diferencias estadísticamente significativas, con una SG a 5 años del 93 % en el grupo de linfomas indolentes y 76,5 % en el grupo linfomas agresivos agresivos ($P=0,38$), mientras que la SLP fue del 84 % y 72 %, respectivamente ($P=0,65$) (Figuras 19 y 20).

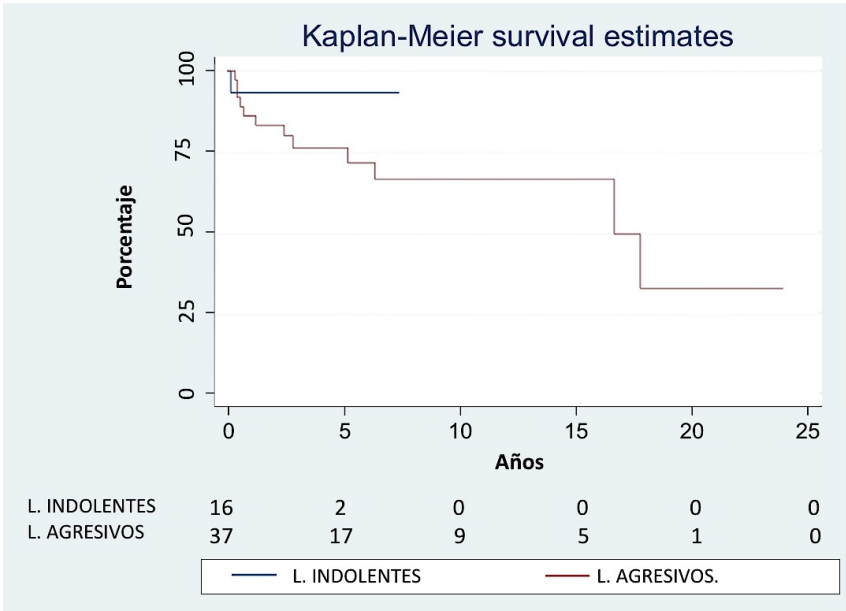


Figura 20. Curvas de supervivencia global en pacientes según la agresividad del tumor.

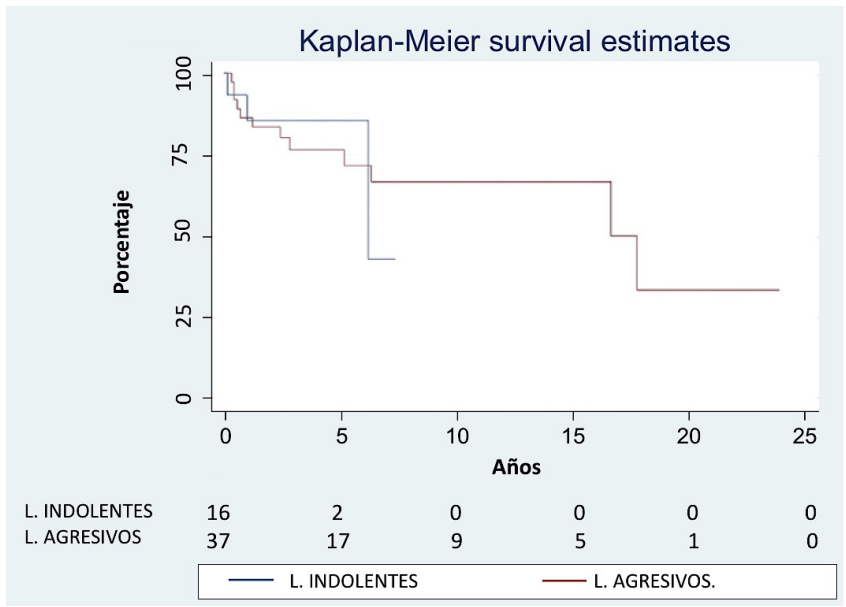


Figura 21. Curvas de supervivencia libre de progresión en pacientes por grupos de edad del linfoma primario de mama.

3. Análisis del estudio inmunohistoquímico y molecular

De un total de 42 muestras de tejido recibidas para el estudio histológico y molecular, 34 correspondieron a bloques de parafina (81 %) y 8 a cortes de tejido parafinado (19 %), todos los casos se acompañaban del informe de anatomía patológica del centro de referencia con la descripción del estudio histológico y de IHQ. La mayor parte de las muestras corresponden a biopsias con aguja gruesa. De las 42 muestras, 33 casos correspondían a casos de LDCGB (78,5 %), 4 LBZM (9,5 %), 2 LACG CD30+ (4,7 %), 1 linfoma linfoblástico (2,3 %), 1 caso de LF (2,3 %) y finalmente 1 caso de BIA-ALCL (2,3 %). De las muestras evaluadas en el laboratorio de anatomía patológica del IVO, 28 de ellas pudieron ser analizadas y confirmar el diagnóstico histológico, pudiéndose evidenciar presencia de tejido mamario residual en la muestra solo en el 36 % de los casos, variando la representación de tumor viable en la muestra entre el 45 y el 100 %. El subtipo histológico más frecuente en el estudio fue el LDCGB y del cual se recibieron un total de 33 muestras. Para el estudio molecular se descartaron 16 casos, 10 de ellos por tener una cantidad de tumor mínima que impidió la extracción de ADN de la parafina y 6 de ellos por tener cantidad y/o calidad insuficiente de ADN para el proceso de secuenciación.

Finalmente, para el estudio molecular se seleccionaron 17 casos correspondientes a LDCGB; uno de ellos (paciente nº 12) presentó una recaída del tumor en la mama contralateral confirmada histológicamente, permitiéndonos tener muestra tanto del tumor inicial (muestra a) como de la recaída (muestra b) con suficiente material para el procesamiento y secuenciación de ambas. Las características clínicas de este grupo de pacientes se detallan en la tabla 15. La clasificación de la célula de origen (COO) se determinó mediante el algoritmo de Hans utilizando los datos disponibles en los informes de anatomía patológica de IHQ (Tabla 16). De los 17 casos de LDCGB que posteriormente fueron secuenciados, el 44,5 % de los casos fueron clasificados como LDCGB tipo GCB, 34 % como LDCGB tipo no-GCB y hubo un 17 % de casos no clasificable dado que la información necesaria para clasificar mediante el algoritmo de Hans no estaba disponible. El 89 % de los casos tenían un índice de proliferación medido mediante Ki67 mayor del 80 %, solo los pacientes 2 y 3 tuvieron un Ki67 de 57 y 70 % respectivamente.

PACIENTE	EDAD	MAMA AFECTA	AFECCIÓN GANGLIONAR	ESTADIO	IPI	QT	CICLOS	RT	RTA	RECAIDA	TRATAMIENTO	TIEMPO A PR	RTA
1	84	IZQ	NO	IE	2	R-CVP	5	SI	RC	-	-	-	-
2	78	DER	NO	IE	1	R-CHOP	4	NO	RC	-	-	-	
3	74	IZQ	NO	IE	2	R-CHOP	4	NO	RC	-	-	-	-
4	40	DER	SI	IIE	0	R-CHOP	4	SI	RC	-	-	-	-
5	60	IZQ	NO	IE	1	R-CHOP	8	NO	RC	-	-	-	-
6	29	DER	NO	IE	0	R-CHOP	6	NO	RC	-	-	-	-
7	78	BIL	SI	IIE	1	R-CHOP	6	NO	RC	-	-	-	-
8	73	IZQ	NO	IE	2	CHOP	6	NO	RC	-	-	-	-
9	75	IZQ	NO	IE	1	R-CHOP	4	NO	RC	-	-	-	-
10	79	IZQ	NO	IE	2	R-CHOP	6	NO	RC	-	-	-	-
11	83	DER	SI	IIE	2	R-MVP	6	NO	RC	GANGLIONAR	NO	7	PR
12	70	DER	NO	IE	1	R-CHOP	6	NO	RC	MAMA CONTRALATERAL	R-ESHAP	80	RC
13	79	IZQ	NO	IE	1	R-CHOP	4	SI	RC	-	-	-	-
14	62	DER	NO	IE	1	R-CHOP	4	SI	RC	CEREBRAL	METOTREXATE	23	PR
15	70	IZQ	NO	IE	2	R-CHOP	6	NO	RC	-	-	-	-
16	46	IZQ	SI	IIE	ND	R-CHOP	6	NO	RC	-	-	-	-
17	42	DER	SI	IIE	ND	R-CHOP	6	SI	RC	MAMA CONTRALATERAL	R-COMP	157	RC

Tabla 15. Características clínicas de pacientes con LDCGB-PM incluidos en el estudio molecular. IPI: Index Prognostic International; QT:Quimioterapia; RT: Radioterapia; RTA: Respuesta; RC: Respuesta completa; PR: Progresión; CHOP: Ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, prednisolona; COMP: Ciclofosfamida, doxorubicina liposomal, vincristina, prednisolona; CVP: Ciclofosfamida, doxvncristina, prednisolona; MVP: Mitomicina, vinblastina, cisplatino; ESHAP: Etoposido, Metilprednisolona, Citarabina, Cisplatino; R: Rituximab.

MUESTRA	CD10	CD20	BCL6	BCL2	MUM1	Ki67	COO
01	+	+	+	+	ND	96 %	GCB
02	-	+	-	+	ND	59 %	Non-GCB
03	-	+	+	+	-	70 %	GCB
04	+	+	+	-	-	80 %	GCB
05	+	+	+	+	ND	80 %	GCB
06	ND	+	+	+	-	80 %	GCB
07	ND	+	+	+	-	90 %	GCB
08	-	+	+	+	-	80 %	GCB
09	-	+	+	+	-	85 %	GCB
10	-	+	+	+	+	80 %	Non-GCB
11	-	+	-	-	+	100 %	Non-GCB
12a	ND	+	ND	ND	ND	98 %	ND
12b	-	+	+	+	+	98 %	Non-GCB
13	ND	+	ND	ND	ND	90 %	ND
14	-	+	+	+	ND	100 %	ND
15	ND	+	+	+	+	80 %	ND
16	-	+	+	+	+	80 %	Non-GCB
17	-	+	+	+	+	80 %	Non-GCB

Tabla 16. Resultados del estudio inmunohistoquímico, índice de proliferación y clasificación de COO. GCB: Germinal center-B; Non-GCB: Non germinal center-B; COO: Célula de origen (en inglés – Cell of origin); ND: No datos.

La cantidad total de ADN en las 18 muestras totales secuenciadas varió entre 30 a 100 ng, siendo la cobertura media para los amplicones para el pool A de 379x (50-1098x) y para el pool B de 426x (30-2149x). Los resultados de secuenciación de las 18 muestras de los 17 pacientes con LDCGB incluidos en el estudio, se encontró un total de 52 mutaciones no sinónimas y 21 mutaciones sinónimas; encontrando al menos 1 gen mutado en 16 de las muestras, teniendo en cuenta exclusivamente mutaciones missense, nonsense y splicing. En los casos correspondientes a los pacientes 2 y 4 no detectamos

ninguna mutación, mientras que los casos 5, 12a y 13 tuvieron el mayor número de genes mutados, con total de 4, 6 y 7 mutaciones respectivamente. La relación de frecuencias mutacionales por muestras y casos se describe detalladamente en la tabla 17. En total, hemos identificado mutaciones en 14 de los 38 genes seleccionados (*PIM1*, *MYD88*, *KMT2D*, *CARD11*, *CD79B*, *PRDM1*, *ATM*, *BRAF*, *CREBBP*, *TNFAIP3*, *CCND3*, *PLCG2*, *TCF3* y *STAT3*) (Figura 20). Los genes más recurrentemente mutados fueron *PIM1* en 9 de 18 muestras (50 %), *MYD88* (7/18, 39 %), *CD79B*, *PRDM1* y *CARD11* (3/18; 17 %), *KMT2D*, *TNFAIP3* y *CREBBP* (2/18; 11 %) (Figura 20 y Tabla 17a-c). Destacamos el caso del paciente número 12, que corresponde a una mujer diagnosticada de LPM en mama derecha en 2010 y posteriormente de una recaída en mama contralateral en 2015, la secuenciación de ambas muestras y nos permitió determinar que ambos tumores comparten solo la mutación en *MYD88* y una sinónima en *PIM1* (Tabla 18a-c), mientras que el resto de los genes mutados (*CREBBP*, *ATM*, *BRAF* y *STAT3*) y las otras mutaciones en *PIM1* fueron diferentes.

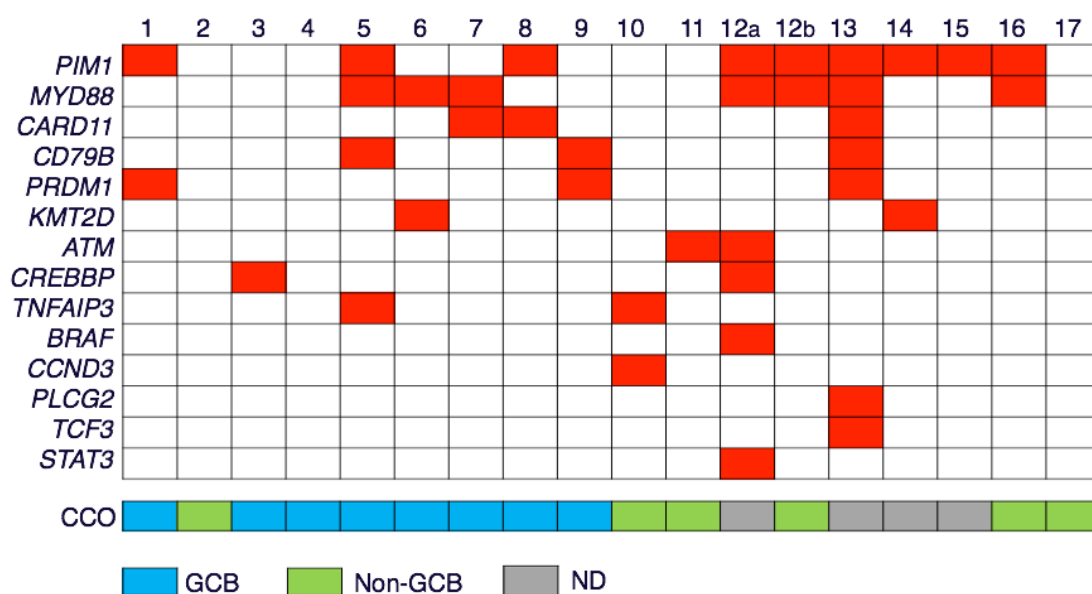


Figura 22. Frecuencias y distribución de las mutaciones en LDCGB-PM y CCO. El total de casos sometidos a secuenciación masiva (38 genes) fue 18, correspondientes a 17 pacientes. El paciente número 12 tenía dos muestras (12a, al momento del diagnóstico y 12b a la recaída). Las columnas representan muestras y las filas los genes. La casilla de color indica al menos una mutación en dicho gen. GCB: Germinal center-B; Non-GCB: Non germinal center-B; CCO: Célula de origen (en inglés – Cell of origin); ND: No datos.

Gen	Nº de muestras mutadas	Frecuencia por muestra (n=18)	Nº de pacientes mutados	Frecuencia por paciente (n=17)
<i>PIM1</i>	9	50 %	8	47,1 %
<i>MYD88</i>	7	38,9 %	6	35,3 %
<i>CARD11</i>	3	16,7 %	3	17,6 %
<i>CD79B</i>	3	16,7 %	3	17,6 %
<i>PRDM1</i>	3	16,7 %	3	17,6 %
<i>KMT2D</i>	2	11,1 %	2	11,8 %
<i>ATM</i>	2	11,1 %	2	11,8 %
<i>CREBBP</i>	2	11,1 %	2	11,8 %
<i>TCF3</i>	1	5,6 %	1	5,9 %
<i>TNFAIP3</i>	1	5,6 %	1	5,9 %
<i>STAT3</i>	1	5,6 %	1	5,9 %
<i>PLCG2</i>	1	5,6 %	1	5,9 %
<i>CCND3</i>	1	5,6 %	1	5,9 %
<i>BRAF</i>	1	5,6 %	1	5,9 %

Tabla 17. Relación de frecuencias mutacionales por muestras y casos.

La alta frecuencia de mutaciones *PIM1* es uno de los hallazgos más relevantes de este estudio, en el que se han identificado un total de 38 mutaciones en 9 de las muestras secuenciadas, de las cuales 21 corresponden a mutaciones no sinónimas, es decir, el 55 % del total y 17 mutaciones sinónimas que representan el 45 % de estas mutaciones (Figura 22). *PIM1* es un gen frecuentemente determinado por una hipermutación somática aberrante (aSHM), pero muchas de las mutaciones no sinónimas, identificadas en este estudio, se localizaron principalmente en el dominio catalítico (aa 38-290) de serina / treonina de doble especificidad de la proteína quinasa.

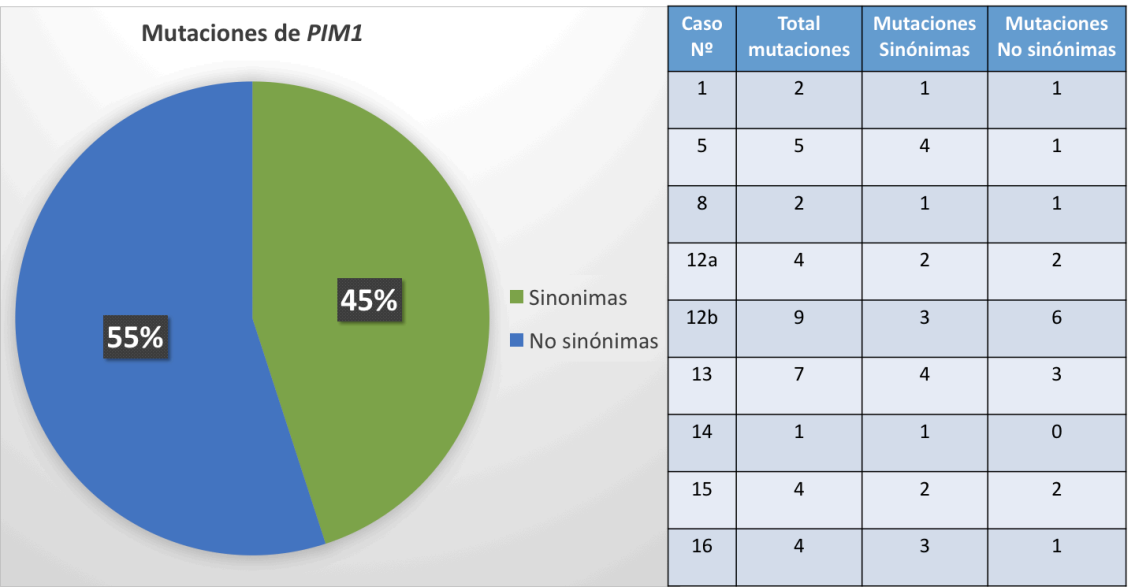


Figura 23. Relación total y por caso de mutaciones de *PIM1* (Sinónimas vs No sinónimas) en pacientes con LDCGB-PM.

El segundo gen más frecuentemente mutado en esta serie es *MYD88*, teniendo los siete casos la mutación L265P, que es la mutación de *MYD88* más recurrentemente encontrada. Las cuatro mutaciones encontradas en *CD79B* (un caso que muestra 2 mutaciones) se encuentran en los exones 5 y 6 que afectan al dominio ITAM (aa 185-213). Dos de ellos afectaron a la tirosina Y196 que también se demostró ser una mutación de ganancia de función implicada en la activación de la vía NFκB. Las mutaciones en *CARD11* afectaron los dominios coiled-coil y CARD (reclutamiento de caspasas).

Sample	Chr	Start	End	Ref	Alt	Location	Gene	Function	Exon	CDS position	AA position	cytoBand	Allele Frequency	Depth	Existing variant/dbsp 1	Existing variant/dbsp 2	Transcript
1	chr12	4944742	4944742	C	T	exonic	KMT2D	synonymous	exon10	c.G2724A	p.L98L	12q13.12	24.22%	739			ENST00000301067
1	chr6	37140780	37140780	G	A	exonic	PIM1	missense	exon5	c.G616A	p.V206M	6p21.2	32.17%	2002			ENST00000373509
1	chr6	37138577	37138577	G	A	exonic	PIM1	synonymous frameshift_variant	exon2	c.G111A c.60_61insCC GGCT	p.Q37Q	6p21.2	58.78%	917		rs751073896, COSM4220744	ENST00000373509
1	chr6	106536093	106536097	C	CTCCA	exonic	PRDM1		exon2	GCT	p.Scr21fs	6q21	49.2	4283			ENST0000036096
3	chr16	3820828	3820828	G	A	exonic	CRFBP	missense	exon14	c.C2623T	p.P875S	16p13.3	26.19%	42			ENST00000262367
5	chr17	62006799	62006799	A	G	exonic	CD79B	missense	exon5	c.T586C	p.Y196H	17q23.3	85.88%	1303	COSM220734 rs387907272	COSM1737939, COSM144393	ENST00000006750.3
5	chr3	38182641	38182641	T	C	exonic	MYD88	missense	exon5	c.T794C	p.L265P	3p22.2	35.28%	326	COSM5416224,COSM85940		ENST00000396334
5	chr6	37138405	37138405	C	A	exonic	PIM1	missense	exon1	c.C54A	p.N18K	6p21.2	41.13%	248			ENST00000373509
5	chr6	37138427	37138427	G	A	exonic	PIM1	missense	exon1	c.G76A	p.A26T	6p21.2	40.80%	250			ENST00000373509
5	chr6	37139097	37139097	G	A	exonic	PIM1	missense	exon4	c.G437A	p.S146N	6p21.2	36.14%	664			ENST00000373509
5	chr6	37139180	37139180	C	T	exonic	PIM1	missense	exon4	c.C520T	p.L174F	6p21.2	35.45%	505			ENST00000373509
5	chr6	138200190	138200190	C	A	exonic	TNFAIP3	stopgain	exon7	c.C1608A	p.C536X	6q23.3	27.41%	704			ENST00000237289
6	chr12	49420433	49420433	G	A	exonic	KMT2D	missense	exon48	c.C15316T	p.R5106C	12q13.12	32.31%	65	COSM939987,COSM939988 rs387907272,COSM5416224, COSM85940		ENST00000301067
6	chr3	38182641	38182641	T	C	exonic	MYD88	missense	exon5	c.T794C	p.L265P	3p22.2	44.05%	336			ENST00000396334
7	chr7	2978320	2978320	C	T	exonic	CARD11	missense	exon7	c.G1010A	p.R337Q	7p22.2	41.67%	1039	rs749237424,COSM43451 rs387907272,COSM5416224, COSM85940		ENST00000396946
7	chr3	38182641	38182641	T	C	exonic	MYD88	missense	exon5	c.T794C	p.L265P	3p22.2	45.56%	698			ENST00000396334
7	chr6	37138577	37138577	G	A	exonic	PIM1	synonymous	exon2	c.G111A	p.Q37Q	6p21.2	39.62%	1565		rs751073896, COSM4220744	ENST00000373509
8	chr6	37140788	37140788	C	T	exonic	PIM1	synonymous	exon5	c.C624T	p.S208S	6p21.2	34.99%	343			ENST00000373509
8	chr6	37139033	37139033	C	T	exonic	PIM1	missense	exon4	c.C737T	p.P125S	6p21.2	25.38%	130	COSM44610026		ENST00000373509
8	chr7	2987341	2987341	G	A	exonic	CARD11	missense	exon3	c.C88T	p.R30W	7p22.2	27.78%	54			ENST00000396946
9	chr17	62006797	62006797	G	C	exonic	CD79B	stopgain	exon5	c.C588G	p.Y196X	17q23.3	31.16%	276			ENST00000006750.3
9	chr6	106536235	106536235	G	A	exonic	PRDM1	missense	exon2	c.G202A	p.D68N	6q21	72.97%	74			ENST0000036096
10	chr6	41903731	41903731	G	A	exonic	CCND3	stopgain	exon5	c.C826T	p.Q276X	6p21.1	32.20%	500	COSM220538		ENST00000372991
10	chr6	138200458	138200459	C	CT	exonic	TNFAIP3	frameshift_variant	exon7	c.1876_1877insT	p.Leu626fs	6q23.3	68	966	COSM5973,COSM56199, COSM3994618,COSM168344		ENST00000237289
11	chr11	108172446	108172446	G	A	exonic	ATM	stopgain	exon35	c.G5249A	p.W1750X	11q22.3	99.11%	2477	COSM1235413		ENST00000278616

Tabla 18 (a). Resultados del estudio molecular con la descripción de las variantes somáticas por caso y gen.

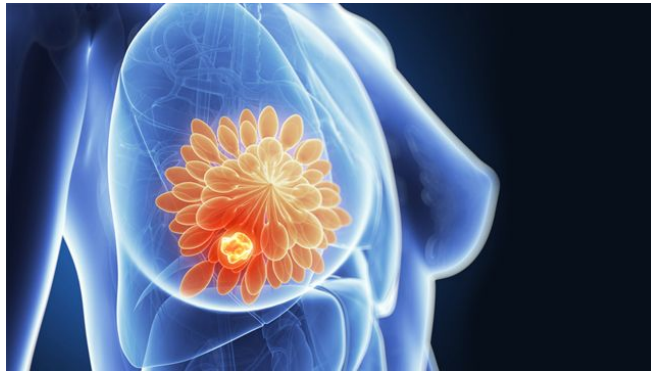
Sample	Chr	Start	End	Ref	Alt	Location	Gene	Function	Exon	CDS position	AA position	cytoBand	Allele Frequency	Depth	Existing variant/dbusp_1	Existing variant/dbusp_2	Transcript
12a	chr7	2962275	2962275	G	A	exonic	CARD11	synonymous	exon17	c.C2262T	p.N75AN	7p22.2	44.84%	223			ENST00000396946
12a	chr11	108119789	108119789	C	T	exonic	ATM	missense	exon9	c.C1195T	p.H399Y	11q22.3	27.27%	176			ENST00000278616
12a	chr7	140482915	140482915	G	A	exonic	BRAF	missense	exon10	c.C1220T	p.P407L	7q34	56.58%	152			ENST00000288602
12a	chr16	3788614	3788614	G	A	exonic	CREBBP	missense	exon26	c.C4340T	p.T1447I	16p13.3	44.58%	424	CM050568, COSM5054884		ENST00000262367
12a	chr3	38182641	38182641	T	C	exonic	MYD88	missense	exon5	c.T794C	p.L265P	3p22.2	72.41%	203	rs387907272, COSM5416224, COSM85940		ENST00000396334
12a	chr6	37138401	37138401	G	A	exonic	PI3K	missense	exon1	c.G50A	p.C17Y	6p21.2	70.71%	437			ENST00000373509
12a	chr6	37139209	37139209	G	A	exonic	PI3K	synonymous	exon4	c.G549A	p.K183K	6p21.2	78.96%	941	COSM5652992		ENST00000373509
12a	chr6	37139039	37139039	C	T	exonic	PI3K	stopgain	exon4	c.C379T	p.Q127X	6p21.2	84.34%	447	COSM4327134		ENST00000373509
12a	chr17	40476822	40476822	G	A	exonic	STAT3	stopgain	exon17	c.C1507T	p.Q503X	17q21.2	23.06%	438			ENST00000264657
12b	chr6	37138580	37138580	C	T	exonic	PI3K	synonymous	exon2	c.C114T	p.Y38Y	6p21.2	53.20%	297	rs48710452, COSM3928004	COSM4171572	ENST00000373509
12b	chr6	37138937	37138937	C	T	exonic	PI3K	synonymous	exon4	c.C277T	p.L93L	6p21.2	31.48%	378			ENST00000373509
12b	chr6	37138945	37138945	G	A	exonic	PI3K	synonymous	exon4	c.G285A	p.K95K	6p21.2	23.86%	373			ENST00000373509
12b	chr6	37138981	37138981	G	A	exonic	PI3K	synonymous	exon4	c.G321A	p.L107L	6p21.2	40.21%	378			ENST00000373509
12b	chr6	37139209	37139209	G	A	exonic	PI3K	synonymous	exon4	c.G549A	p.K183K	6p21.2	49.13%	920	COSM5652992		ENST00000373509
12b	chr6	37140788	37140788	C	T	exonic	PI3K	synonymous	exon5	c.C624T	p.S208S	6p21.2	43.78%	3120			ENST00000373509
12b	chr6	37138625	37138625	C	G	exonic	PI3K	stopgain	exon2	c.C159G	p.Y53X	6p21.2	49.30%	284		COSM27133	ENST00000373509
12b	chr6	37138946	37138946	G	C	exonic	PI3K	missense	exon4	c.G286C	p.Y96L	6p21.2	46.49%	370	COSM44610023		ENST00000373509
12b	chr6	37139210	37139210	C	T	exonic	PI3K	missense	exon4	c.C550T	p.L184F	6p21.2	31.96%	920	COSM1731954		ENST00000373509
12b	chr3	38182641	38182641	T	C	exonic	MYD88	missense	exon5	c.T794C	p.L265P	3p22.2	51.54%	1042	rs387907272, COSM5416224, COSM85940		ENST00000396334
13	chr7	2977612	2977612	A	T	exonic	CARD11	missense	exon8	c.T1072A	p.C358S	7p22.2	43.21%	2055			ENST00000396946
13	chr17	62006647	62006647	A	G	exonic	CD79B	missense	exon6	c.T629C	p.L210T	17q23.3	57.81%	365			ENST00000006750.3
13	chr17	62006680	62006680	A	T	exonic	CD79B	missense	exon6	c.T596A	p.L199Q	17q23.3	57.81%	365		COSM1737940, COSM4371803, COSM5656386	ENST00000006750.3
13	chr3	38182641	38182641	T	C	exonic	MYD88	missense	exon5	c.T794C	p.L265P	3p22.2	56.07%	1350	rs387907272, COSM5416224, COSM85940		ENST00000396334
13	chr6	37139104	37139104	C	T	exonic	PI3K	synonymous	exon4	c.C447T	p.F148F	6p21.2	72.18%	417			ENST00000373509
13	chr6	37138580	37138580	C	T	exonic	PI3K	synonymous	exon2	c.C114T	p.Y38Y	6p21.2	78.20%	1376		COSM4171572	ENST00000373509
13	chr6	37139209	37139209	G	A	exonic	PI3K	synonymous	exon4	c.G549A	p.K183K	6p21.2	53.19%	1585	COSM5652992		ENST00000373509
13	chr6	37138808	37138808	G	T	intronic	PI3K	splice donor variant				6p21.2	69.72%	852			ENST00000373509
13	chr6	37138597		TGGGCA GCGGCG	T	exonic	PI3K	frameshift variant	exon2	c.132del11	p.Leu44fs	6p21.2	79.6	3214			ENST00000373509
13	chr6	37139029		CGAGCC GGT	C	exonic	PI3K	frameshift variant	exon4	c.GGT	p.Gln124fs	6p21.2	38	7991			ENST00000373510
13	chr6	37139210	37139210	C	T	exonic	PI3K	missense	exon4	c.C550T	p.L184F	6p21.2	42.15%	1585	COSM1731954		ENST00000373509
13	chr16	81929465	81929465	C	T	exonic	PLCG2	missense	exon13	c.C1126T	p.R376W	16q23.3	34.57%	3775			ENST00000359376
13	chr6	106536324	106536324	G	C	exonic	PRDM1	missense	exon2	c.G291C	p.E97D	6q21	95.89%	1338	COSM571513, COSM97162		ENST00000369096
13	chr19	1622393	1622393	C	T	exonic	TTCF3	missense	exon9	c.G571A	p.E191K	19p13.3	61.62%	383			ENST00000262965

Tabla 18 (b). Resultados del estudio molecular con la descripción de las variantes somáticas por caso y gen.

Sample	Chr	Start	End	Ref	Alt	Location	Gene	Function	Exon	CDS position	AA position	cytoBand	Allele Frequency	Depth	Existing variant/dbSNP_1	Existing variant/dbSNP_2	Transcript
14	chr12	49440169	49440169	C	T	exonic	KMT2D	missense	exon16	c.G4457A	p.G1486D	12q13.12	22.68%	97			ENST00000301067
14	chr12	49433401	49433401	C	T	intronic	KMT2D	splicing acceptor variant	intron31			12q13.12	20.18%	114			ENST00000301067
14	chr6	37138424	37138424	C	G	exonic	PIM1	missense	exon1	c.C73G	p.L25V	6p21.2	28%	150	rs774607869, COSM220737		ENST00000373509
15	chr6	37138769	37138769	C	T	exonic	PIM1	missense	exon3	c.C202T	p.H68Y	6p21.2	46.77%	541			ENST00000373509
15	chr6	37138976	37138976	C	T	exonic	PIM1	missense	exon4	c.C316T	p.L106F	6p21.2	60.88%	363			ENST00000373509
15	chr6	37138786	37138786	G	A	exonic	PIM1	synonymous	exon3	c.G219A	p.R73R	6p21.2	81.00%	279			ENST00000373509
15	chr6	37139098	37139098	C	T	exonic	PIM1	synonymous	exon4	c.C438T	p.S146S	6p21.2	29.90%	388	COSM5651447		ENST00000373509
15	chr6	138200301	138200301	C	T	exonic	TNFAIP3	synonymous	exon7	c.C1719T	p.S573S	6q23.3	23.81%	105			ENST00000237289
16	chr3	38182641	38182641	T	C	exonic	MYD88	missense	exon5	c.T794C	p.L263P	3p22.2	58.62%	203	rs387907272, COSM5416224, COSM85940		ENST00000396334
16	chr6	37138354	37138354	G	A	exonic	PIM1	start lost	exon1	c.G3A	p.M1I	6p21.2	43.89%	401	rs759294703, COSM5656321		ENST00000373509
16	chr6	37138916	37138916	G	C	exonic	PIM1	missense	exon4	c.G256C	p.V86L	6p21.2	71.93%	374		COSM4610149	ENST00000373509
16	chr6	37139204	37139204	C	T	exonic	PIM1	missense	exon4	c.C544T	p.L182F	6p21.2	72.51%	542			ENST00000373509
16	chr6	37139203	37139203	G	A	exonic	PIM1	synonymous	exon4	c.G543A	p.E181E	6p21.2	24.39%	537		COSM220739	ENST00000373509
16	chr6	106536315	106536315	C	T	exonic	PRDM1	synonymous	exon2	c.C282T	p.N94N	6q21	69.71%	1116			ENST00000369096

Tabla 18 (c). Resultados del estudio molecular con la descripción de las variantes somáticas por caso y gen.

DISCUSIÓN



El linfoma primario de mama como se ha comentado previamente, es una entidad poco frecuente que afecta a dicha glándula y a los ganglios axilares, sin evidencia de enfermedad sistémica. En la mayoría de las series el LPM representa un estimado del 1 % de todos los LNH y menos del 3 % de los linfomas extraganglionares (Cheah CY *et al*, 2014; Jeanneret-Sozzi W *et al*, 2008; Talwalkar S *et al*, 2008); sin embargo, no podemos conocer su incidencia real debido a la falta de registros nacionales específicos. El presente estudio tiene como objetivo principal la realización de una descripción detallada de la serie de pacientes con diagnóstico de LPM tratados en servicios de oncología médica adscritos al grupo GOTEL en diferentes centros médicos distribuidos a lo largo del territorio español, así como realizar la descripción del análisis del estudio molecular dirigido al subgrupo de linfoma difuso de célula grande B primario de mama y la posible implicación de las alteraciones encontradas en la linfomagénesis de este tumor, comparándolo con los datos de los estudios moleculares del mismo subtipo histológico de origen ganglionar y otros extraganglionares como el linfoma cerebral primario y el testicular.

En una publicación reciente del National Cancer Institute sustentada en datos de su base SEER (*Surveillance, Epidemiology and End Result Program*), se analizan dos cohortes de pacientes con afectación mamaria por linfoma y considerándose como primarios aquellos en que la ficha lo determinase como linfoma extraganglionar de única localización (Thomas A *et al*, 2016). La cohorte para estimar la incidencia incluyó el período 1975-2013, mientras que la cohorte para la estimación de la incidencia, tratamientos y supervivencia por subtipo comprendió el período 2000-2013. Según este análisis del SEER, la incidencia del LPM ha presentado un aumento en las últimas décadas, pasando de 0,66 por 1.000.000 mujeres en 1975-1977 a 2,96 en 2011-2013, con un cambio de porcentaje anual del 5,3 % en Norteamérica. Igualmente se ha podido determinar un aumento de la incidencia en mujeres de menos de 50 años entre 1977 y 2013 con un cambio de porcentaje anual del 2,8 %. El análisis del tipo histológico se ha realizado basándose en una muestra total de 1034 mujeres y solo incluye las cuatro histologías más frecuentes (LDCGB, LF, LBZM y BIA-ALCL), lo cual discutiremos en profundidad en líneas posteriores. Por su parte, los datos en Europa y Asia derivan de publicaciones de instituciones únicas o de grupos cooperativos regionales, ya que no existen registros nacionales que nos den una información global que se asemeje a la del SEER.

En el caso concreto de España, nuestro estudio se posiciona como el primer análisis multicéntrico del LPM, con pacientes de diferentes regiones y comunidades autónomas, lo cual nos permite tener una representación global de la población y de la situación de esta patología en nuestro medio y por tanto, se puede considerar que nuestros datos cuentan con una adecuada validez y pueden ser representativos de la situación de la enfermedad a nivel nacional.

1. Características generales de la serie

Los datos de los pacientes se han extraído de una base exclusiva de LPM centralizada en el HUPH y que concentra la información clínica detallada de cada uno de los pacientes. Toda esta información ha sido recogida por cada uno de los investigadores de cada hospital participante en un formulario predeterminado y se encuentra codificada por el sistema en el CRD de RedCap cumpliendo con las normas de la ley de protección de datos. El análisis se ha realizado con la colaboración de la unidad de estadística del HUPH.

El primer factor que se ha analizado es la media de edad al diagnóstico que en la población estudiada es de 69 años, siendo similar a la descrita en población americana que está alrededor de los 67 años (Caón J *et al*, 2012; Radkani P *et al*, 2014; Thomas A *et al*, 2017) y algo superior a la publicada en series europeas que se sitúa en los 64 años (Fruchart C *et al*, 2005; Martinelli G *et al*, 2009; Avenia N *et al*, 2010). Sin embargo, cuando se analizan los resultados de los estudios en población asiática, se puede evidenciar que en esta población la media de edad de presentación del LPM es al menos una década menor que en occidente, situándose en torno a los 50 años (Guo HY *et al*, 2008; Yhim HY *et al*, 2010; Zhao S *et al*, 2011).

A pesar de que la media de edad de nuestra serie de pacientes es de 69 años, el rango de presentación de la enfermedad va desde los 29 hasta los 86 en el análisis global, mientras que para el caso del subtipo LDCGB se sitúa en los 65 años y para las histologías indolentes es de 62 años. Mención especial merecen los casos de pacientes con linfomas agresivos como el linfoma de Burkitt del cual las publicaciones son escasas y se limitan a reportes de casos donde la edad media de presentación de la

enfermedad es de 30 años, con un rango que habitualmente se sitúa entre los 24 y 45 años (Khalbuss W *et al*, 2006; Negahban S *et al*, 2010; Savvari P *et al*, 2010) y del cual no tenemos casos propios en nuestra serie. Finalmente, otro subtipo que tenemos que resaltar es el de los BIA-ALCL cuya edad media de presentación es de 52 años (Miranda R *et al*, 2014; Thomas A *et al*, 2017), presentándose nuestros 3 casos a los 43, 51 y 55 años respectivamente.

En el análisis por grupos de edad, pudimos determinar que la incidencia es claramente mayor a medida que se avanza en décadas, identificándose un 17 % de casos en pacientes menores de 40 años, 35,8 % entre 41 y 60 años y un 47 % en mayores de 60 años. Si contrastamos nuestros resultados con los de la base del SEER, vemos que en nuestra serie el 69 % de los casos se han diagnosticado en pacientes mayores de 50 años y el 31 % restante en menores de esta edad, frente a los datos americanos que se corresponden al 84 % y 16 % respectivamente (Thomas A *et al*, 2017).

Con respecto al sexo, casi la totalidad de los LPM se presentan en mujeres, mientras que los casos en hombres son aislados y no representan más del 4,5 % de pacientes (Ryan G *et al*, 2008; Sun Y *et al*, 2016). En nuestra serie el 96,4 % de los casos correspondían a mujeres (53 pacientes) y solo dos casos se dieron en hombres (3,6 %), uno de ellos un LH y el otro un LDCGB, por tanto la proporción por sexo (M/H) en esta serie de casos es de 27,5:1.

Aunque en nuestro estudio existe un mayor porcentaje de pacientes con afectación de la mama derecha, no hay datos claros que apoyen que exista una predilección del LPM por esta. Del total de nuestros pacientes, el 52,7 % presentó afectación de la mama derecha, otro 40 % la mama contralateral y solo el 7,27 % presentaron afectación bilateral glandular mamaria, es decir un total de 4 pacientes. El porcentaje de casos con afectación bilateral es similar a las series publicadas anteriormente y que generalmente está determinado en su mayor parte por linfomas de alto o muy alto grado como el LDCGB y/o el linfoma de Burkitt, presentándose este último de forma bilateral en casi la totalidad de casos descritos y con una afectación casi completa de las glándulas mamarias y del tejido ganglionar axilar (Horowitz NA *et al*, 2013), acompañándose de compromiso del estado general y síntomas B al diagnóstico. En contraste, de los 4 casos

de afectación bilateral que hemos descrito en nuestro estudio, solo 2 correspondieron a linfomas de alto grado (LDCGB) y 2 casos a linfomas indolentes (1 LF y 1 LBZM).

Aunque tradicionalmente hemos utilizado el sistema de Ann Arbor para clasificar los linfomas extraganglionares como es el caso de la mama, sigue existiendo una falta de consenso para definir el estadio de los pacientes que tienen afectación glandular bilateral y por tanto existen grupos que definen estos casos como estadio II_E y otros como el IELSG que los define como estadio IV_E (Ryan G *et al*, 2008). Sin embargo, nosotros hemos decidido clasificar a los pacientes con afectación bilateral como estadios II_E, para diferenciarlos de aquellos casos de linfomas con afectación ganglionar de mama que a su vez tienen afectación de otros órganos linfoides o extraganglionares. Por tanto, siguiendo los criterios de estadificación de Ann-Arbor y considerando los casos de afectación bilateral mamaria como estadio II_E, hemos podido establecer que el 58,2 % de los casos correspondieron a estadios I_E mientras que el 41,8 % restante eran estadios II_E y solo dos pacientes presentaron en algún momento de la enfermedad síntomas B, lo cual se puede explicar por la escasa afectación tumoral que presentan estos pacientes a pesar de que sea o no un linfoma de alto grado (Caón J *et al*, 2012; Chea CY *et al*, 2014).

Tratamiento

Con respecto a los tipos de tratamientos utilizados en el manejo de estos pacientes debemos recordar como dijimos en secciones previas, que no está estandarizado y puede incluir la cirugía, la quimioterapia y la radioterapia, solas o en combinación.

Los pacientes intervenidos quirúrgicamente fueron un total de 21, es decir, el 38,2 % del total de nuestra serie. Con respecto a otras publicaciones la tasa de intervenciones quirúrgicas en nuestro estudio ha sido algo mayor, probablemente por las dificultades diagnósticas de los casos. El procedimiento más frecuentemente realizado fue la tumorectomía en el 60 % de las intervenciones, seguido de la mastectomía simple (25 %) y 3 casos de reemplazo de prótesis y/o capsulectomía (15 %), estos últimos correspondientes a casos de BIA-ALCL. Dado que en muchos casos la presentación clínica es similar a la de un cáncer de mama y que no hay claros datos radiológicos que puedan sugerir que se trate de un linfoma, el abordaje diagnóstico inicial es el de un cáncer de mama y por tanto el estudio diagnóstico se inicia con la realización de una

BAG o PAAF, las cuales en el caso de los linfomas está demostrado ser insuficientes para establecer con certeza la etiología. Estas limitaciones en el diagnóstico histológico es lo que justifica que un porcentaje no despreciable de pacientes sea necesaria la resección quirúrgica de la masa. Las técnicas quirúrgicas varían desde la tumorectomía hasta la mastectomía simple, pasando por cuadrantectomía y el recambio de prótesis. En el año 2007, se publicó un estudio que recoge información de más de 450 pacientes con LPM diagnosticadas entre 1972 y 2005 y se analiza el valor de la cirugía y la linfadenectomía axilar y su impacto en la supervivencia. De un total de 465 pacientes, 165 fueron tratadas con mastectomía (simple o radical modificada) sola o en combinación con otros tratamientos como QT o RT, el análisis de supervivencia demostró que la resección quirúrgica del tumor, no aporta beneficios en términos de SLP ni de SG y más aún, cuando se analiza específicamente las diferencias en las técnicas quirúrgicas, se evidencia que tampoco existen diferencias en supervivencia en el grupo de mastectomía simple frente al de mastectomía radical modificada (Jennings WC *et al*, 2007).

Una situación diversa es el manejo de pacientes con BIA-ALCL, en el cual está demostrado que la intervención quirúrgica es parte fundamental del tratamiento del LPM debido a que la prótesis tiene una relación directa con el desarrollo de la enfermedad. Si bien la patogénesis de BIA-ALCL es poco conocida, se ha planteado que esta se encuentra asociada a una inflamación crónica inducida por los implantes y determinada una estimulación persistente de células T alrededor de dicha prótesis (George EV *et al*, 2013; Bizjak M *et al*, 2015). Esta respuesta inmune mantenida en el tiempo podría conducir una alteración estructural genética y degenerar en el desarrollo de un linfoma en pacientes biológicamente susceptibles (Orciani M *et al*, 2016). No se han identificado claramente factores etiológicos como causa de la estimulación inmune crónica. Se han planteado algunos factores como causales del BIA-ALCL, incluyendo una respuesta inmune anormal frente a partículas de los implantes texturizados, la presencia de un biofilm subclínico, un traumatismo capsular repetido o una predisposición genética, pero estas no se han confirmado en estudios epidemiológicos formales (George EV *et al*, 2013; Bizjak M *et al*, 2015; Blombery P *et al*, 2016; Yoshida SH *et al*, 1995). Si bien es cierto que la mayor parte de los casos reportados son asociados a prótesis texturizadas, también se han reportado casos diagnosticados en pacientes con implantes lisos (Zakhary JM *et al*, 2013; Lista F *et al*, 2013). Por

desgracia, no tenemos información relacionada con el tipo de prótesis utilizada en nuestras pacientes. Lo que si está claro es la asociación implante-linfoma y por tanto, en esta población, está demostrado que el tratamiento debe ser la capsulectomía y la extirpación de la prótesis que será seguida o no de tratamiento de QT según cada caso. De esta forma podremos alcanzar tasas de RC superiores al 95 % en los casos del BIA-ALCL tipo seroma y del 72 % en el tipo masa (Miranda RN *et al*, 2014).

En nuestra serie, solo un paciente con histología indolente (linfoma folicular) se mantuvo en observación sin llegarse a evidenciar progresión de la enfermedad al momento del cierre y análisis de nuestro estudio, cuando habían transcurrido 24 meses desde el diagnóstico. Como es bien conocido, la observación con tratamiento en el momento de la progresión es una opción de manejo aceptable para los pacientes con LF de estadio limitado y es una opción particularmente atractiva si se espera una morbilidad significativa de la RT. Los estudios que apoyan la observación como opción de manejo son estudios retrospectivos, apoyados por la observación de largas series de pacientes tratados en instituciones individuales y grupos corporativos. Entre estos estudios destacan el de Advani R y colaboradores que reporta una mediana de SG de 19 años en pacientes con LF estadios I y II en los que se realiza solo seguimiento, con tasas de supervivencia estimadas a 5, 10 y 20 años de 97 %, 85 % y 22 %, respectivamente (Advani R *et al*, 2004).

El tratamiento de QT, dependerá evidentemente del tipo histológico del que se trate. El 80 % de los pacientes de nuestra serie recibió tratamiento de QT con una media de entre 4-6 ciclos. Los dos pacientes diagnosticados de LPM tipo linfoma de Hodgkin se trataron con quimioterapia con esquema ABVD, requiriendo uno de ellos previamente cirugía tipo tumorectomía para determinar el tipo histológico de la neoplasia que radiológicamente era maligna e indistinguible de un cáncer de mama de tipo epitelial. El paciente sometido a resección de la masa era estadio I_E y recibió tras la cirugía 2 ciclos de ABVD seguido de RT, mientras que el paciente que no se sometió a cirugía y era un LH clásico tipo esclerosis nodular estadio II_E por afectación ganglionar y pronóstico desfavorable, recibió 6 ciclos de QT con el mismo esquema hasta alcanzar una respuesta radiológica completa y que se ha mantenido hasta el cierre del estudio. Aunque tradicionalmente el tratamiento del LH en estadios precoces consistió en el uso de RT con tasas de RC cercanas al 95 %, sigue existiendo un alto porcentaje de

pacientes (20-30 %) en los cuales falla el control de la enfermedad y recaen local o sistémicamente (Yung L & Linch D, 2003). Por tanto, el papel del tratamiento de QT es indudable en la mejoría de las tasas de SLP y SG, lo cual ha sido validado en diversos ensayos clínicos entre los que destacan el estudio de la EORTC H6 (Carde P *et al*, 1993), el del grupo italiano (Pavone V *et al*, 2008) y el del grupo alemán GHSG HD14 (von Tresckow B *et al*, 2012). En el caso de nuestros pacientes se escogió como esquema de tratamiento el ABVD por sus importantes tasas de respuesta y supervivencia, así como por su perfil de toxicidad.

Los pacientes con linfomas T que recibieron tratamiento, se trataron con el esquema CHOP y pacientes con linfomas B (CD20+) recibieron R-CHOP o esquemas similares, los cuales han demostrado disminuir significativamente las tasas de recaída local y a distancia, así como una mejora tanto en la SLP como en la SG en pacientes con LPM (Cao J *et al*, 2012). Como ocurre en el manejo del linfoma B de origen ganglionar, el tratamiento de elección tradicional y más estudiado es el esquema CHOP asociado actualmente a rituximab. Sin embargo, no es el único esquema utilizado y lo que parece ser importante es que el esquema contenga una antraciclina. En el estudio del IELSG con 204 pacientes con LDCGB-PM solo el 70 % recibió un esquema de QT que incluyó antraciclina y se ha podido evidenciar en los pacientes que no las recibieron peores tasas de SLP y SG (Ryan G *et al*, 2008). En un estudio coreano realizado en 16 instituciones con 68 pacientes, se pudo igualmente comprobar que el uso de antraciclinas mejora las tasas de supervivencia de la enfermedad y al realizar un análisis de supervivencia en relación al número de ciclos que QT administrados, se observó que los pacientes que reciben menos de 4 ciclos tienen peor supervivencia frente al grupo de pacientes que recibió más de 4 ciclos, siendo la SLP a 5 años de 28 % vs 58 % y la SG a 5 años de 19,3 % vs 66,2 % (Yhim HY *et al*, 2010). Las limitaciones que se plantean en estos y muchos otros estudios es que incluyen pacientes de la era pre-R y la era-R, por tanto puede haber un sesgo en el impacto real de las antraciclinas y de los anticuerpos monoclonales anti CD20. Existen otros esquemas de QT utilizados pero con mucha menor representación en los estudios que en la actualidad se usan en combinación con rituximab como CVP, COMP, MVP, BACOP, ESHAP y el ABVD, como está reflejado en la tabla 10. Los casos de linfomas de muy alto grado como el linfoma Burkitt solo disponemos de reportes de casos en los que evidentemente se han empleado diversos esquemas de QT de alta intensidad como el hiper-CVAD (ciclofosfamida, vincristina,

doxorubicina, dexametasona e intratecales con metotrexato y citarabina), CODOX-M/IVAC (ciclofosfamida, vincristina, doxorubicina, altas dosis de metotrexato / ifosfamida, etoposido y altas dosis de citarabina) y el régimen del CALGB-9251 (Savvari P *et al*, 2010).

Desde la introducción de rituximab en el esquema de tratamiento de los LNH CD20+ de origen ganglionar se ha evidenciado una mejora en términos de tasas de respuesta y supervivencia y que parece también ser superponible a los pacientes con LPM. Los pocos estudios que han evaluado el valor del rituximab en LPM, no parecen demostrar que exista claro beneficio ni en términos de supervivencia ni de disminución de tasas de recaída en el SNC (Avilés A *et al*, 2007; Hosein PJ *et al*, 2014; Yhim HY *et al*, 2012); sin embargo, estos resultados no pueden ser generalizados dado el poder estadístico limitado de estas 3 series. Un estudio retrospectivo realizado en diferentes centros médicos que analiza un grupo de 24 pacientes diagnosticadas de LDCGB-PM y tratadas con esquema CHOP con o sin rituximab, sugiere que la adición del anticuerpo al tratamiento si que puede tener impacto en términos de supervivencia frente a las que no lo reciben. La escasa muestra y el hecho de que solo el 41 % de las pacientes recibió R hacen que el estudio no tenga un poder estadístico suficiente que confirme los resultados; sin embargo, la hipótesis queda abierta para futuras investigaciones (Zhang N *et al*, 2016). De nuestros 45 pacientes con LNH que fueron tratados con quimioterapia, 38 recibieron rituximab (84,4 %). Los 7 casos restantes no recibieron el anti-CD20 dado que eran pacientes diagnosticados en la era pre-rituximab (2 casos) o bien eran linfomas T (5 casos). Igualmente, de estos 45 pacientes, el 77,5 % recibieron antraciclinas como parte de los esquemas de quimioterapia. Si bien estos son datos que se asemejan a los publicados en otras series, dada la escasa muestra es imposible comparar grupos de tratamiento y por tanto sacar conclusiones sólidas.

Por otra parte el 36,4 % de los pacientes fueron tratados con RT sola o en combinación con otros tratamientos. Más concretamente, sólo 2 pacientes fueron tratados con irradiación exclusiva y serán linfomas indolentes que entraron en remisión completa radiológica y sin datos de recaída documentada al momento del cierre del estudio y análisis de los datos. Las publicaciones que hay actualmente y donde se evalúa el papel de la RT son limitadas ya que menos de la mitad especifica el tipo de RT, los volúmenes y la dosis. Adicionalmente, los pacientes incluidos han sido tratados en

períodos de tiempo de décadas y por tanto no serían probablemente comparables las técnicas de tratamiento utilizado en la RT. Independientemente de ello, el análisis realizado por Jennings y colaboradores sobre un total de 465 pacientes, demostró que la adición de RT al manejo de la enfermedad dio como resultado una mejoría en la SG (47,9 % versus 37,1 %, $P = 0,07$) especialmente en pacientes sin afectación ganglionar axilar (Jennings W *et al*, 2007). En el estudio del IELSG el 64 % de los pacientes (130 de los 204) recibieron RT sobre el volumen mamario con o sin campo ganglionar, lo cual se asoció a mejoría en la SG mas no en la SLP. Estos resultados podrían estar justificados por el hecho de que más del 70 % de los pacientes solo tenían afectación glandular mamaria y no ganglionar y el impacto en SG podría haber sido efecto del tratamiento multimodal en este subgrupo. En el caso de los pacientes con afectación ganglionar, no hubo impacto en SLP (Ryan G *et al*, 2008). En el estudio multicéntrico del Rare Cancer Network el tratamiento de RT se asoció a mejor control local de la enfermedad pero no de la SG y la SLP (Jeanneret-Sozzi W *et al*, 2008). A día de hoy, el único ensayo clínico aleatorizado que evalúa el papel de la irradiación en el LBDCGB-PM fue publicado en 2005 por Avilés y colaboradores. En este estudio hubo 3 brazos de tratamiento (RT sola, QT sola y terapia combinada RT/QT). Los resultados fueron favorables al grupo de terapia combinada, en el cual se logró una mayor tasa de RC, así como una mejoría en SG y SLP (Avilés A *et al*, 2005). Es probable que los linfomas de bajo grado y crecimiento lento puedan ser tratados con RT en aquellos casos en que no sea seguro el uso de tratamiento sistémico, esto ha sido sugerido nuestros resultados en el análisis de los 55 casos de LPM, de los cuales 2 correspondían a linfomas de bajo grado tratados con RT exclusiva, sin datos de progresión tras un largo seguimiento. Por tanto, si bien parece que la RT puede tener un importante papel en el tratamiento del LPM, no existen datos suficientemente sólidos para recomendarla en todos los casos y por tanto su uso debe ser individualizado.

En resumen, se considera que no existe un tratamiento establecido como estándar en el LPM; sin embargo, se debe valorar el tratamiento multimodal con QT y RT y en casos muy seleccionados añadir la profilaxis del SNC (discutido en líneas posteriores). El papel de la cirugía queda restringido al diagnóstico de la enfermedad cuando no sea posible llegar a el mediante otras técnicas y evidentemente en el caso particular del BIA-ALCL en el que es parte fundamental del manejo.

Tipos de respuesta al tratamiento de 1ª línea

En general, podemos decir que el LPM es un tumor muy quimio-sensible y por tanto las tasas de respuesta son altas. En la serie estudiada, la tasa de RC tras el primer tratamiento superó el 85 % (TRC total 86,7 %), la tasa de RP fue del 5,4 %, seguida de 3,7 % de estabilización de la enfermedad (1 caso) y 3,7 % fueron progresión de la enfermedad (1 caso). En términos generales, la tasa de respuestas objetivas en nuestro estudio se asemeja a la de series previas aunque ligeramente más baja si la comparamos con los trabajos de autores como Avilés que reportó en su serie de 96 pacientes publicada en 2005 una tasa de RC del 88 %, Hosein en un grupo de 76 pacientes comunicó una TRC del 91 % en 2012 y Niitzu del 96 % en una serie de 30 pacientes en 2008 (Avilés A *et al*, 2005; Hosein P *et al*, 2012; Niitzu N *et al*, 2008). De las dos pacientes progresadas a primera línea de QT, un caso correspondía a un LDCGB y otro a BIA-ALCL; este último recae tras cuatro ciclos de CHOP y muere a causa de la enfermedad. Si analizamos los tipos de respuesta según la agresividad del linfoma, en el presente estudio hemos podido demostrar una mayor tasa de respuestas completas en pacientes con linfoma agresivo en comparación con los linfomas indolentes, las cuales fueron del 92 % frente al 75 % respectivamente.

Patrón de recaída y tratamiento de rescate

En el momento de cierre de nuestro estudio se documentaron 10 recaídas de la enfermedad, todas en el grupo de pacientes con linfomas de alto grado y que están descritas en la tabla 12 en la sección de resultados. Como era de esperar, hubo recaídas locales y ganglionares sistémicas, además del caso de dos pacientes con recaída contralateral y dos pacientes con recaída a nivel del sistema nervioso central. Estos datos son congruentes con series más grandes que hay publicadas sobre el tema; sin embargo, surge aquí una de las polémicas más importantes en torno al riesgo de recaída a nivel del SNC. Ninguno de los 55 casos incluidos en la serie del grupo GOTEL recibió profilaxis con QT intratecal para reducir el riesgo de recaída central. Se han publicado datos que sugieren un mayor riesgo de diseminación a nivel del SNC si lo comparamos con linfomas de otros orígenes; sin embargo, los porcentajes reportados

son muy variables como por ejemplo el descrito en un estudio en población mexicana, con tasas de recaída en SNC en torno al 12 % (Avilés A *et al*, 2005), en contraste con otras series en las que esta se encuentra en torno al 4,5 % que es similar al riesgo de diseminación central de los linfomas de origen ganglionar (Villa D *et al*, 2010). La limitación principal en la mayor parte de los estudios de LPM es el número de pacientes incluidos en los estudios y que podrían no estar representando la realidad biológica de la enfermedad y no se traducirían en un verdadero riesgo para la población afectada por la enfermedad. Es por ello que Aviv y colaboradores hacen un análisis de los datos publicados y encuentran que de los 24 trabajos publicados en los que se informa el patrón de recaída del LPM, la afectación del SNC se objetivó en 82 de 930 pacientes, es decir un 8,8 %. Sin embargo, si consideramos que el riesgo de recaída en el SNC del LBDCG de origen ganglionar es del 3-5 %, queda la duda de si es necesario implementar el tratamiento profiláctico intratecal en todos los pacientes con LPM (Aviv A *et al*, 2013). En esta serie española, la tasa de recaídas en el SNC fue de 3,7 % con lo cual la recomendación de profilaxis aconsejan debe ser individualizada y dirigida probablemente a los pacientes de más alto riesgo como los estadios II_E con tumores mayores de 5 cm.

De los 10 casos de recaída de la enfermedad identificados, 9 recibieron tratamiento de segunda línea de QT alcanzando RC en el 50 % de los casos, 40 % progresaron y murieron por causa de la enfermedad y 10 % de estabilidad de la enfermedad con posterior progresión y muerte por la misma causa. La paciente que no recibió tratamiento de 2ª línea de QT corresponde a un caso de LDCGB mal estado funcional que impidió la administración de tratamiento de rescate. Ello indica que el tumor sigue siendo quimio-sensible; sin embargo, el mayor reto terapéutico está en el manejo de los casos de recaída a nivel cerebral, ya que en estos casos la tasa de mortalidad es muy elevada. Si consideramos que el LPM es una entidad rara en la que no tenemos datos prospectivos y comparativos de tipos de tratamiento en primera línea, el caso del manejo de la enfermedad en recaída se constituye en un terreno aún menos claro. Sin embargo, la experiencia en el manejo de la enfermedad en recaída o refractaria de los linfomas de origen ganglionar, nos ha permitido abordar de forma segura los casos y alcanzar tasas de respuestas completas similares a las que se logran en primera línea dado que la enfermedad al parecer continúa siendo sensible a la QT. El primer aspecto a tener en cuenta como es habitual en la práctica clínica es el patrón de recaída, si se trata

de una recaída local, en mama contralateral o sistémica, y si tiene o no compromiso del sistema nervioso central. En el caso de los linfomas de bajo grado, se puede plantear el uso de la RT local como tratamiento radical en aquellas pacientes que previamente no han recibido tratamiento de irradiación consolidativa tras el tratamiento sistémico de QT con buenas tasas de respuesta, mientras que en el caso de la recaída sistémica de la enfermedad, el tratamiento sistémico de QT es la indicación con o sin adición de rituximab según si estamos frente a un caso de linfoma CD20 + o no. Los esquemas utilizados con más frecuencia son los que han demostrado tener beneficio en supervivencia en pacientes con linfomas recaídos, entre los cuales destaca el ESHAP (etoposido, prednisona, citarabina y cisplatino), DHAP (dexametasona, citarabina y cisplatino), ICE (ifosfamida, carboplatino y etoposido), COMP (ciclofosfamida, prednisona y myocet). Ninguno de los esquemas anteriores ha demostrado ser superior a otro y por tanto la elección dependerá de la experiencia del centro y del médico tratante (Gisselbrecht C *et al*, 2010). El caso particular en el que existe recaída con afectación del SNC debe abordarse de forma multidisciplinar. En primera instancia, es fundamental el control de la enfermedad tanto a nivel central como sistémico y por lo tanto el tratamiento de elección es de QT, salvo casos concretos que comentaremos posteriormente. El uso de la RT no es sistemático, se debe ajustar a las condiciones de cada paciente y se puede utilizar desde el inicio en aquellos pacientes con grandes masas o con lesiones que condicionen obstrucción del flujo normal del líquido cefalorraquídeo (LCR) y por tanto amenacen a muy corto plazo la vida del paciente. La técnica utilizada dependerá del caso, reservando el tratamiento holocraneal como terapia de salvamento. Los agente de QT utilizados de forma sistémica, atraviesan la barrera hematoencefálica y se distribuyen adecuadamente en el tejido neuronal y LCR. Sin embargo, para ello es necesario utilizar dosis altas que pueden tener importante toxicidad a nivel medular como es el caso del metotrexato a altas dosis y la citarabina. De igual forma, se puede plantear el uso de terapia intratecal con estos dos fármacos, asociados a poliquimioterapia sistémica con o sin rituximab según el caso (Peñalver FJ *et al*, 2017).

Supervivencia

La supervivencia global a 5 años del linfoma primario de la mama está en torno al 80 % en la gran mayoría de los estudios (Ganjoo K *et al*, 2007; Hosein P *et al*, 2014), aunque existe una gran variabilidad según algunas otras series como en el caso del estudio de Hai-Yi publicado en 2008 en el cual la SG fue del 50 % a 5 años en un grupo de 48 pacientes. Estudios como el de Hai-Yi tienen la limitación de ser estudios retrospectivos en una única institución y un periodo de tiempo de tratamiento muy amplio. En nuestro grupo de pacientes con LNH-PM la SG fue del 80 % a los 3 años, 76 % a los 5 años y 71 % a los 10 años y la SLP de 78 %, 73 % y 64 % a los 3, 5 y 10 años respectivamente, los cuales se asemejan al global de pacientes occidentales afectados por LPM. Solo hemos encontrado una variable estadísticamente significativa y es en relación a la SLP y el uso de antraciclinas o no, siendo esta de 81.7 % frente a 61.2 % a los 3 años y de 76.6 % frente a 61 % a los 5 años, siendo en este caso estadísticamente significativa ($P= 0.05$). Datos similares a los encontrados en el estudio del IELSG en el que se analizaron 204 pacientes con LDCGB-PM y de los cuales solo el 70 % recibió un esquema de QT que incluyó antraciclina y cuyo análisis pudo evidenciar que los pacientes que no recibieron antraciclinas tienen peores tasas tanto de SLP y como de SG (Ryan G *et al*, 2008)

Factores pronósticos de recaída

Como esperábamos desde la puesta en marcha de este estudio, no hemos encontrado en nuestra serie ni en las publicadas hasta ahora, ningún dato clínico fiable para determinar el riesgo de recaída. Algunos autores han propuesto el estadio de la enfermedad, la presencia de afectación ganglionar o la bilateralidad de la afectación mamaria; sin embargo, son factores no validados (Jeanneret-Sozzi W *et al*, 2008; Ryan G *et al*, 2008; Chea CY *et al*, 2014). Más aún, los índices pronósticos propuestos como el IPI y el FLIPI per se llevan implícito el fallo de que dos de los ítems que se valoran no son aplicables al LPM (estadio III-IV y la afectación de órganos extraganglionares). En nuestra serie, los 10 casos de recaída eran homogéneos en cuanto al tipo histológico (LDCGB) y de ellos un 50 % eran estadio I_E y 50 % estadio II_E. Por tanto consideramos que hasta la fecha no existen datos clínicos que permitan predecir o determinar un

subgrupo de pacientes de mayor riesgo de recaída y es ello lo que nos motivó a buscar elementos objetivos moleculares que nos ayuden en este empeño.

2. Características anatomopatológicas

Como se ha descrito en la sección de resultados, hemos recuperado muestras de tejido de 42 pacientes, la mayor parte de las muestras corresponden a biopsias con aguja gruesa. De las 42 muestras, 33 casos correspondían a casos de LDCGB, es decir, el 78,5 % y de las cuales 28 fueron evaluadas por patólogos expertos en el laboratorio de anatomía patológica del Instituto Valenciano de Oncología, confirmándose el diagnóstico histológico. La representación de tumor viable por muestra varió entre el 45 y el 100 %, bastante más alto que lo reportado en otras series que está entre el 20-40 % (Taniguchi *et al*, 2016). Estas variaciones, pueden estar determinadas no solo por el tumor, sino también por el tipo de técnica utilizado para la obtención del material para el estudio histológico. De estas 33 muestras de LDCGB se descartaron para el estudio molecular un total de 16, generalmente por la escasa cantidad de tejido representado en las biopsias o bien por la mala calidad de ADN obtenido. Los 17 casos restantes fueron analizados histológicamente y posteriormente secuenciados. Uno de los aspectos llamativos es que el 89 % de los casos tenían un índice de proliferación medido mediante Ki67 mayor del 80 %, solo los pacientes 2 y 3 tuvieron un Ki67 de 57 % y 70 %, respectivamente. Como es sabido, el índice de proliferación de la célula tumoral es un indicador pronóstico de las enfermedades neoplásicas en general, pero con un particular valor en el caso de los linfomas. El Ki67 es una proteína que se expresa en las fases activas del ciclo celular: G2, S y M, de todas las células que se encuentran en proliferación, no siendo detectable en la fase G0 ni en la primera etapa de G1 (Gerdes J *et al*, 1984). De esta forma tenemos una medición cuantitativa del índice de proliferación tumoral, el cual está directamente asociado a la agresividad del tumor y por tanto aporta una información valiosa que tiene un impacto en el pronóstico de la enfermedad. En el caso de los linfomas, uno de los primeros estudios que demuestra la importancia de la medición del índice de proliferación en el pronóstico de la enfermedad fue liderado por Southwest Oncology Group (SWOG 8516 – Intergrup 0067), el cual analizó el valor de la cuantificación del Ki-67 en un grupo de 60 pacientes con linfomas, tratados con esquemas diferentes de QT. Los resultados indican

que pacientes con un índice proliferativo mayor o igual de 80 % tienen un claro impacto negativo en términos de SG comparado con aquellos con un bajo índice proliferativo (Miller TP *et al*, 1994). Los datos sobre el impacto negativo en supervivencia en pacientes con LNH del estudio de Miller TP, también han sido reproducidos en otros estudios (Szczuraszek K *et al*, 2008; Li ZM *et al*, 2012). Finalmente, un metanálisis que incluyó 27 estudios con 3902 pacientes, demostró que un Ki-67 elevado se asocia a peores tasas de supervivencia en pacientes con linfomas, incluidos el LH y los linfomas T/NK (He X *et al*, 2014). Con respecto al análisis del impacto del Ki-67 en linfomas extraganglionares, como es habitual en este tipo de linfomas, la información es limitada. Los resultados de un estudio coreano en 50 pacientes diagnosticados de linfoma T/NK nasal estadios I_E y II_E, apoyan también que el subgrupo de pacientes con tumores con un índice de proliferación elevado (>65 % en este estudio) tienen peor SG y SLP y por tanto sugieren que este indicador, sea utilizado de forma sistemática para clasificar a los pacientes en grupos de riesgo (Kim SJ *et al*, 2007). Igualmente los resultados de un estudio realizado en 45 casos de pacientes con linfoma primario del SNC, sugiere que un elevado índice de proliferación (Ki-67 >90 %) debe ser considerado un factor pronóstico desfavorable independiente (Cho U *et al*, 2016). En el caso del LPM tenemos esta información detallada en al menos 2 estudios, los cuales reportan en sus pacientes un valor promedio de Ki-67 del 55 % (Taniguchi K *et al*, 2016) y del 79 % (Yoshida S *et al*, 2012). De los 17 casos de LDCGB incluidos en el estudio molecular solo 2 pacientes tuvieron un Ki-67 menor del 70 %, mientras que el resto varió entre el 80-100 %. Es importante destacar que 3 de las 4 pacientes recaídas presentaron un índice de proliferación de entre el 98 % y el 100 %, mientras que el de pacientes sin evidencia de recidiva fue inferior al 90 % en la mayor parte de los casos. Estos datos nos podrían sugerir que al igual que sucede en los casos de linfomas primarios del SNC, el Ki-67 debería ser analizado en mas profundidad, para determinar si constituye o no un predictor independiente de recaída de la enfermedad, ya que a pesar de estar descrito en los trabajos antes mencionados, en ellos no se analizó su posible asociación la supervivencia y el riesgo de recaída de los pacientes. Los datos de la serie aquí descrita nos plantean por tanto, que puede existir una relación entre estos factores; sin embargo, el reducido número de pacientes nos limita llegar a conclusiones contundentes sobre su valor real.

La clasificación de la célula de origen se determinó mediante el algoritmo de Hans utilizando los datos disponibles en los informes de anatomía patológica de IHQ y posteriormente hemos contrastado estos resultados con los del estudio de secuenciación. De los 17 casos de LDCGB que posteriormente fueron secuenciados, el 44,5 % de los casos fueron clasificados como LDCGB tipo GCB, 34 % como LDCGB tipo non-GCB y hubo un 17 % de casos no clasificable dado que la información necesaria para clasificar mediante el algoritmo de Hans no estaba disponible. Cuando hacemos una revisión general de la bibliografía sobre los datos de la COO en pacientes con LPM, vemos que solo esta se encuentra descrita en 6 estudios publicados entre 2005 y 2016 (Tabla 19), de los cuales 5 tienen una clara predominancia del porcentaje de casos clasificados según los algoritmos tradicionales como non-GCB variando el porcentaje entre el 57 % (Niitsu N *et al*, 2008) y el 95 % (Yhim HY *et al*, 2012). Sin embargo, si se hace un análisis global de los casos de estos seis estudios, tenemos un total de 245 pacientes en los cuales se ha determinado la COO, correspondiendo el 22 % a casos GCB, 68 % a non-GCB y solo un 10 % no determinado. Por tanto, se puede considerar que el tipo predominante de COO en el LPM es el non-GCB. Si bien es cierto que los resultados de este estudio muestran un mayor porcentaje de casos de LDCGB tipo GCB, es posible que sea justificado por el hecho de que en la determinación realizada por IHQ tenemos un 17 % de casos no clasificables. A demás, los resultados del perfil mutacional de estos pacientes sugieren que el subtipo predominante es el ABC como se expone más adelante y que es concordante con lo estudios previos. Estos datos, ponen de manifiesto las limitaciones que pueden surgir al momento de determinar la COO utilizando métodos de IHQ los cuales tienen una concordancia con la de los perfiles de expresión génica en torno al 80 % (Zhang J *et al*, 2013).

LDCGB-PM CLASIFICACIÓN DE COO (IHQ)			
AUTOR	TOTAL DE CASOS	GCB	Non-GCB
Yoshida S, 2005	15	15 (100 %)	0 (0 %)
Talwalkar S, 2008	26	8 (31 %)	17 (65 %)
Niitsu N, 2008	30	13 (43 %)	17 (57 %)
Avilés A, 2012	104	ND	80 (77 %)
Yhim HY, 2012	20	1 (5 %)	19 (95 %)
Li D, 2012	22	5 (23 %)	17 (77 %)
Taniguchi K, 2016	28	11 (39 %)	16 (57 %)
Farnco F, 2017	17	(44,5 %)	(34 %)

Tabla 19. Clasificación de la COO en pacientes con LDCGB-PM. COO: Célula de origen (en inglés – Cell of origen); GCB: Germinal center-B; Non-GCB: Non germinal center-B; LDCGB-PM: Linfoma difuso de célula grande B primario de mama; ND: No datos.

3. Análisis molecular del subgrupo de pacientes con linfoma difuso de célula grade B primario de mama

El estudio de los mecanismos moleculares iniciales del linfoma primario de mama, nos debería ayudar a entender no solo la biología de la enfermedad, sino también a identificar potenciales dianas terapéuticas que se puedan estudiar e incorporar al tratamiento de esta enfermedad. Es por ello que nuestro trabajo ha llevado a cabo la secuenciación de 18 muestras correspondientes a 17 pacientes con LDCGB, de los cuales se disponía de tejido parafinado del diagnóstico y así como de la confirmación histológica de la recaída. En este análisis molecular, hemos encontrado un total de 52 mutaciones no sinónimas y 21 mutaciones sinónimas, identificando al menos una mutación en 16 de los 18 casos secuenciados. Se identificaron mutaciones no sinónimas en *PIMI*, *MYD88*, *KMT2D*, *CARD11*, *CD79B*, *PRDMI*, *ATM*, *BRAF*, *CREBBP*, *TNFAIP3*, *CCND3*, *PLCG2*, *TCF3* y *STAT3* (Figura 23), siendo los más frecuentemente mutados *PIMI* en el 50 % de los casos, seguido de *MYD88* en el 39 %, *CD79B*, *PRDMI* y *CARD11* en el 17 % y finalmente *KMT2D*, *TNFAIP3* y *CREBBP* que están mutados cada uno de ellos en el 11 % de los casos.

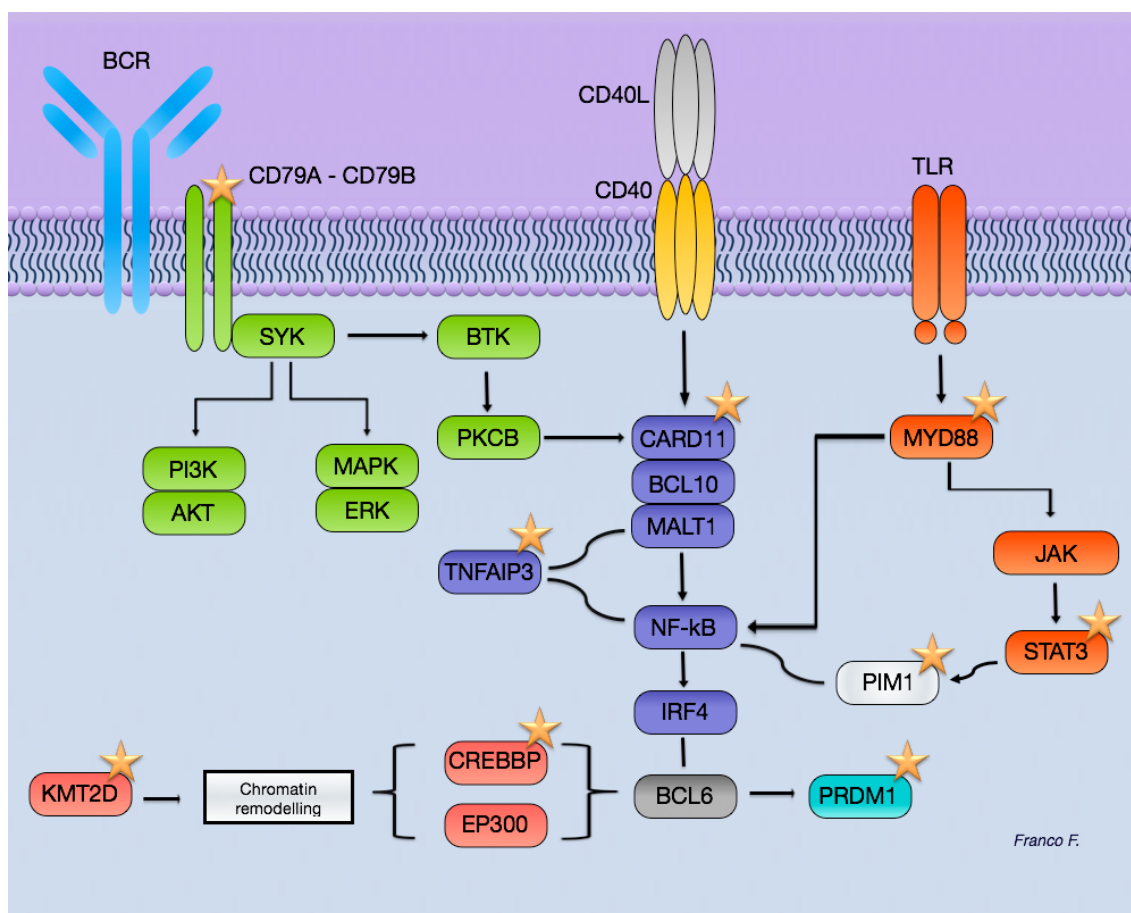


Figura 24. Representación esquemática de genes mutados en LDCGB-PM.

Nuestro grupo ha tenido la oportunidad de secuenciar las muestras del tumor del LDCGB-PM al momento del diagnóstico y de la recaída de una de nuestras pacientes y se ha evidenciado que ambos tumores sólo comparten la mutación de *MYD88* y una sinónima en *PIM1*, lo cual nos sugiere que ambos tumores comparten un precursor común, pero siguieron caminos completamente diferentes, dando lugar a diferentes linfomas. Es aquí donde surge la importancia del conocimiento de los eventos biológicos que condicionan la evolución del tumor y por tanto la presentación clínica de la enfermedad, con dos conceptos que se pueden considerar complementarios y que son el de la célula madre tumoral (en inglés *Cancer Stem Cell* - CSC) y el de la heterogeneidad y evolución clonal del tumor. El modelo de la CSCs, plantea que las neoplasias se originan a partir de una célula única en la que se acumulan alteraciones genéticas a lo largo del proceso del ciclo celular que condicionan alteraciones de los mecanismos de detección de daños en el ADN y su reparación, degenerando finalmente en su malignización (Reya T *et al*, 2001; Vlashi E & Pajonk F, 2015). De acuerdo a este modelo, los tumores estarían organizados jerárquicamente de manera similar al tejido

del que provienen, de tal forma que sólo una pequeña subpoblación de células tumorales (CSCs) sería la responsable del mantenimiento y progresión tumoral gracias a su capacidad de autorrenovación y diferenciación (Reya T *et al*, 2001; He S *et al*, 2009). Mientras que el concepto de evolución clonal sugiere que puede existir uno o varios clones que evolucionan de forma diversa, surgiendo entre ellos uno predominante al diagnóstico y otro u otros diferentes durante con la recaída, gracias a la adquisición de mutaciones adicionales que favorecen la proliferación de una subpoblación competitiva que se convierte en dominante (Nowell PC, 1976; Greaves M & Maley CC, 2012). Ahora bien, a pesar de los avances en los estudios moleculares realizados en linfomas no se han dilucidado completamente los mecanismos implicados en la evolución natural de la enfermedad. Sin embargo, podemos asegurar que se trata de una patología biológicamente compleja que no puede ser explicada por un único modelo y menos aún por un patrón genético evolutivo lineal, por tanto sigue siendo este un campo de investigación continua de gran interés científico.

Sin lugar a dudas, el hallazgo más relevante de nuestro estudio es la alta frecuencia de mutaciones en *PIM1* el cual pertenece a una familia de genes denominada PIM por sus iniciales en inglés (*Proviral Integrations of Moloney virus*), descubierta en 1980. PIM es una familia de serina/treonina quinasas, que consta de 3 isoformas (PIM1, PIM2 y PIM3) que comparten una alta homología de secuencia a nivel de aminoácidos (Nawijn MC *et al*, 2011). Normalmente, las quinasas Pim se expresan ampliamente en tejidos hematopoyéticos, así como a nivel neuronal, vascular y cardíaco, entre otros (Mikkers H *et al*, 2004). Los estudios en ratones transgénicos han podido determinar que la actividad oncogénica de PIM1 en linfomas puede estar asociada a inserciones provirales en una pequeña región cromosómica, inducidos por el virus de la leucemia murina (MuLV) que condiciona la activación transcripcional de este gen. Igualmente, estudios *in vitro* han demostrado un aumento exponencial del oncogen *MYC* en las células linfomatosas en tumores inducidos por MuLV y por tanto se planteó la hipótesis de la necesaria colaboración entre PIM1 y MYC en el proceso de la linfomagénesis (Selten G *et al*, 1984). Los genes *PIM* generalmente muestran características de respuesta primaria que son regulados de forma estricta por la activación y fosforilación de factores de transcripción en vías de señalización como JAK-STAT (Miura O *et al*, 1994; Wierenga AT *et al*, 2008) y NFκB (Li J *et al*, 2001; Zhu N *et al*, 2001) con actividades fisiológicas determinantes en el control del crecimiento celular, la diferenciación y la

apoptosis (Nawijn MC *et al*, 2011). Por tanto, *PIM1* se define como proto-oncogén, está ubicado en el brazo corto del cromosoma 6 (6p21.2) tiene un tamaño de 5.283 bases (Figura 24) y ejerce su potencial tumorigénico mediante la regulación de la actividad transcripcional de MYC, la regulación de la progresión del ciclo celular y la fosforilación e inhibición de las proteínas proapoptóticas como BAD, MAP3K5 y FOXO3.

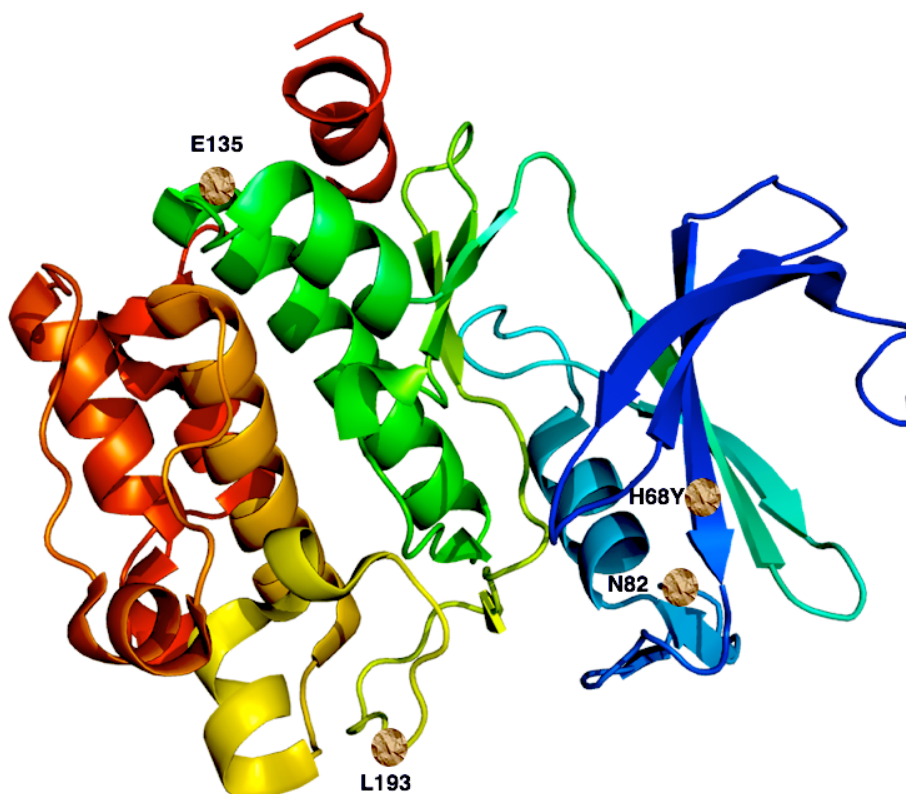


Figura 25. Representación esquemática de la estructura de PIM1 con la ubicación de las mutaciones puntuales clinicamente relevantes en LDCGB. Tomado y modificado de Gene Cards Human Gene Databade y PyMol (2017).

La fosforilación de MYC conduce a un aumento de la estabilidad de la proteína MYC y con ello un aumento de la actividad transcripcional y esta estabilidad, ejercida por *PIM1* podría explicar en parte la fuerte sinergia entre estos dos oncogenes en el proceso de la tumorigénesis. El efecto de control de *PIM1* sobre BAD a través de su fosforilación induce la liberación de la proteína anti-apoptótica Bcl-X (L) / BCL2L1 (Li YY *et al*, 2006; Macdonald A *et al*, 2006) y mediante la fosforilación de MAP3K5, otra proteína proapoptótica, disminuye significativamente la actividad de MAP3K5 quinasa e inhibe la fosforilación mediada por MAP3K5 de JNK y JNK / p38MAPK, reduciendo posteriormente la activación de caspasa-3 y la apoptosis celular. Ahora, el estímulo en

la progresión del ciclo celular en las transiciones G1-S y G2-M viene dado por fosforilación de CDC25A y CDC25C, que resultan en la generación de una proteína más estable que promueve la progresión del ciclo, la CDKN1A. Esta sobreexpresión de la actividad Pim quinasas ha sido documentada en trabajos previos en diferentes neoplasias malignas humanas, como es el caso del cáncer de mama y próstata (Cibull TL *et al*, 2006), pero se sabe también que lo hace de una forma particular en tumores hematológicos (Mondello P *et al*, 2014; Zhang J *et al*, 2013). En la figura 25, se encuentra esquematizada la función regulatoria de *PIM1*.

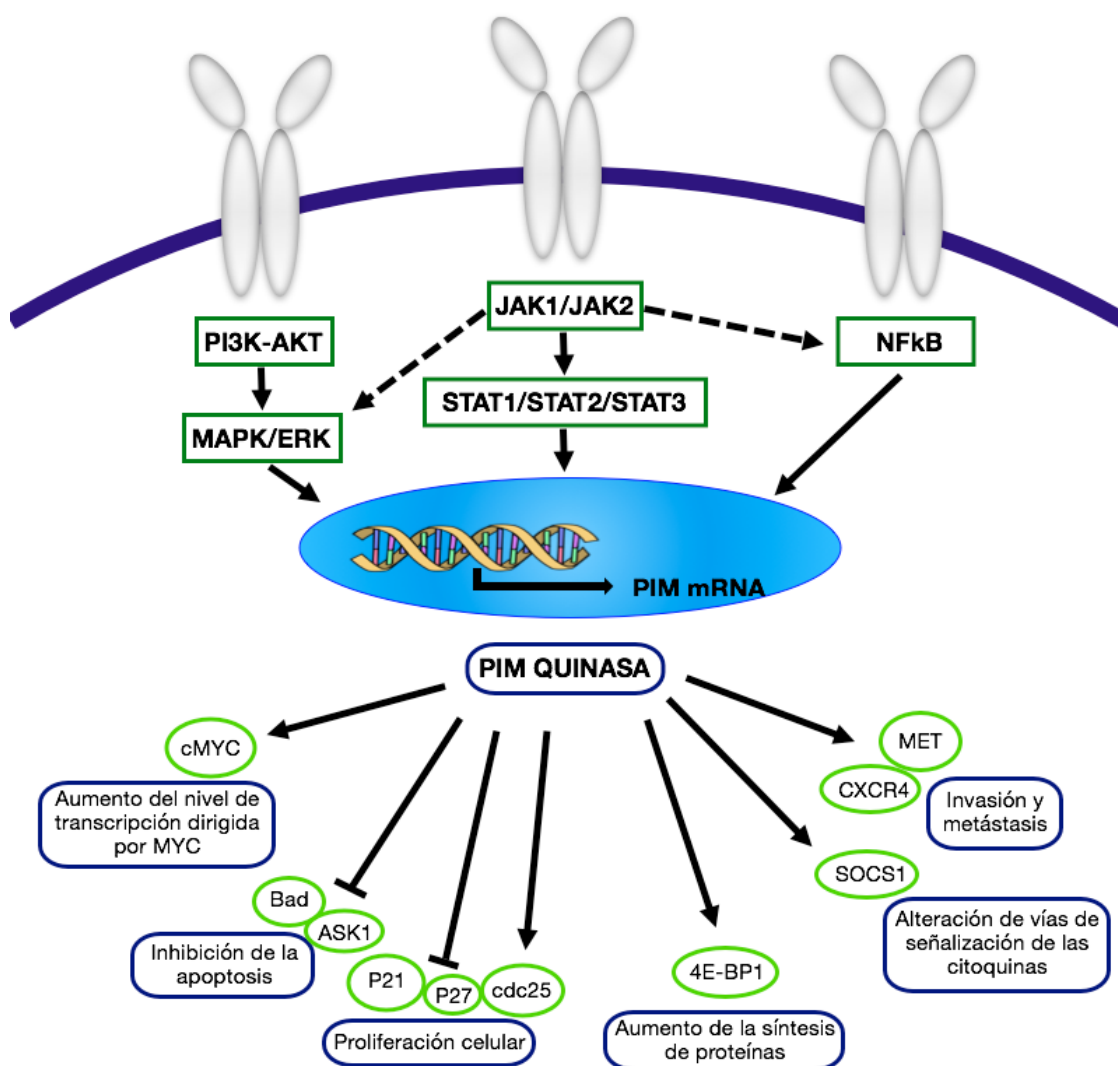


Figura 26. Representación esquemática de la acción de PIM1 en el control de proliferación y supervivencia de la célula. Basado en el artículo de Mondello *et al*, 2014 del Journal of Hematology & Oncology.

Es precisamente la alta frecuencia de mutaciones *PIMI* uno de los hallazgos más relevantes de nuestro estudio, donde hemos identificado en 9 muestras 21 mutaciones no sinónimas y 17 mutaciones sinónimas de *PIMI*, un gen frecuentemente blanco del fenómeno de aSHM en el LDCGB de novo en pacientes tanto inmunocompetentes como inmunocomprometidos (Libra M *et al*, 2005), así como en casos de linfomas ganglionares (Kumar A *et al*, 2005) y los de origen extraganglionar en el caso de los linfomas primarios cerebrales (Montesinos-Rongen M *et al*, 2004) y esplénicos (Deutsch A *et al*, 2005). La aSHM es una característica frecuente y específica de los linfomas agresivos y es menos frecuente en los casos de linfomas indolentes, con una mayor frecuencia de presentación en los LDCGB extraganglionares si los comparamos con el linfoma de MALT. La importancia de esta sobre expresión de *PIMI* en pacientes con linfomas agresivos radica en que este subgrupo de pacientes tiene un peor pronóstico y puede por tanto ser un factor predictivo independiente (Alizadeh A *et al*, 2000; Wright G *et al*, 2003).

Es importante destacar que muchas de las mutaciones no sinónimas que hemos identificado en este estudio, se localizaron principalmente en el dominio catalítico (aa 38-290) de serina / treonina de doble especificidad de la proteína quinasa. Una de estas mutaciones (p.H68Y) se ha informado anteriormente que aumenta la actividad de la enzima en comparación con el tipo salvaje (Kumar A *et al*, 2005) (Figura 24). Sin embargo, otros como las que afectan a los aminoácidos L184, L182, S146 y P125, anteriormente descritos (Peters TL *et al*, 2016), se ha demostrado que no afectan a la actividad catalítica de la proteína. Nuestros resultados muestran una mayor frecuencia de mutaciones en *PIMI* (50 % de las muestras) en comparación con otros linfomas de origen ganglionar cuya frecuencia se sitúa entre el 12 y el 30 % (Niitsu N *et al*, 2008; Hosein P *et al*, 2014) o los de origen extraganglionar, representados en casi su totalidad por casos de linfomas cerebrales primarios en los cuales la frecuencia mutacional de *PIMI* está entre el 22 y el 25 % (Bruno A *et al*, 2014; Nakamura T *et al*, 2016; Cao Y *et al*, 2016), lo cual probablemente tenga implicaciones en la presentación clínica y curso de este tipo de linfomas.

Desde hace algunos años se viene investigando sobre el potencial terapéutico de la inhibición de *PIMI* en varios tipos de neoplasias sólidas y hematológicas entre ellas el LDCGB, en el cual hasta el 50 % de los casos tienen mutaciones en dicho gen. Los

datos de los que disponemos actualmente vienen dados de estudios de eficacia de moléculas anti-*PIMI* en líneas celulares y xenoinjertos. Existe evidencia de una gran actividad de estas nuevas moléculas cuando se usan solas o en combinación, como en el caso del cáncer de próstata en el que se ha demostrado que el inhibidor específico de *PIMI* NMS-P645 solo o en combinación con inhibidores de PI3K, es eficaz en el control del crecimiento de la célula tumoral (Mologni L *et al*, 2017). En el cáncer de mama triple negativo y la leucemia mieloide aguda se han visto resultados similares con una molécula pan-inhibidora de *PIM* denominada AZD1208 (Brasó-Maristany F *et al*, 2016; Doshi KA *et al*, 2016), mientras que en modelos de xenoinjertos de LH se mostró retrasar el crecimiento tumoral en un 95,8 %, además de disminuir la expresión de múltiples moléculas comprometidas en el desarrollo del microambiente inmunosupresor, incluyendo galectina-1 y PDL1 / 2 con la utilización del pan-inhibidor de *PIM* SEL24-B489 (Szydlowski M *et al*, 2017). Otros trabajos exploratorios plantean la opción de inhibición de *PIMI* como potencial diana en el tratamiento del LDCGB (Brault L *et al*, 2012) y que en algunos estudios ya han demostrado efectividad en líneas celulares de LDCGB de fenotipo ABC como en el caso del pan-inhibidor PIM447 (Peters TL *et al*, 2016). Todos estos datos resultan de importancia porque apoyan nuestra teoría de que *PIMI* puede ser un posible objetivo a explorar en el manejo de pacientes con LDCGB-PM.

MYD88 es el segundo gen más frecuentemente mutado en nuestra serie. Los siete casos mutados tuvieron la mutación L265P, que es la mutación más recurrentemente encontrada de este gen y que está demostrado que es una mutación activante que conduce a la activación de la vía de NFκB, al ser una mutación de ganancia de función (Figura 26). En el estudio realizado por Ngo VN, se demostró que hasta el 29 % de los LDCGB tipo ABC albergaba la misma sustitución de aminoácidos en el dominio TIR / receptor de IL-1 de *MYD88* (L265P), en un residuo evolutivamente conservado en su núcleo hidrófobo (Ngo VN *et al*, 2011; Kim Y *et al*, 2014). Esta mutación de *MYD88* tiene la capacidad de promover la supervivencia celular mediante la activación de la vía NFκB dependiente de los Toll-Like Receptors (TLR) y que a través de la interacción con el dominio TIR del receptor facilita la fosforilación de IRAK1, mediada por IRAK4, lo cual a su vez induce la actividad de cinasa de IRAK1. En esta etapa, IRAK1 se autofosforila, generando sitios de interacción para TRAF6 para culminar con la

activación de factores de transcripción tales como NFκB y los factores reguladores del interferón (Wang JQ *et al*, 2014) (Figura 27).

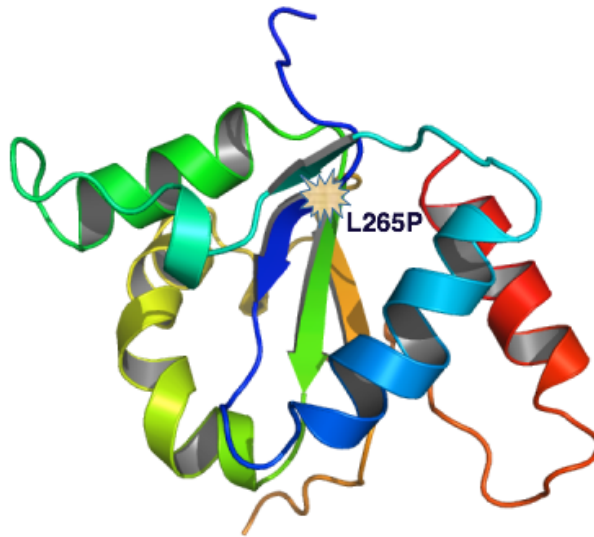


Figura 27. Representación esquemática de la estructura de receptor TLR10 y ubicación de la mutación L265P de *MYD88*. Tomado y modificado de <http://www.thesgc.org/structures/2j67>.

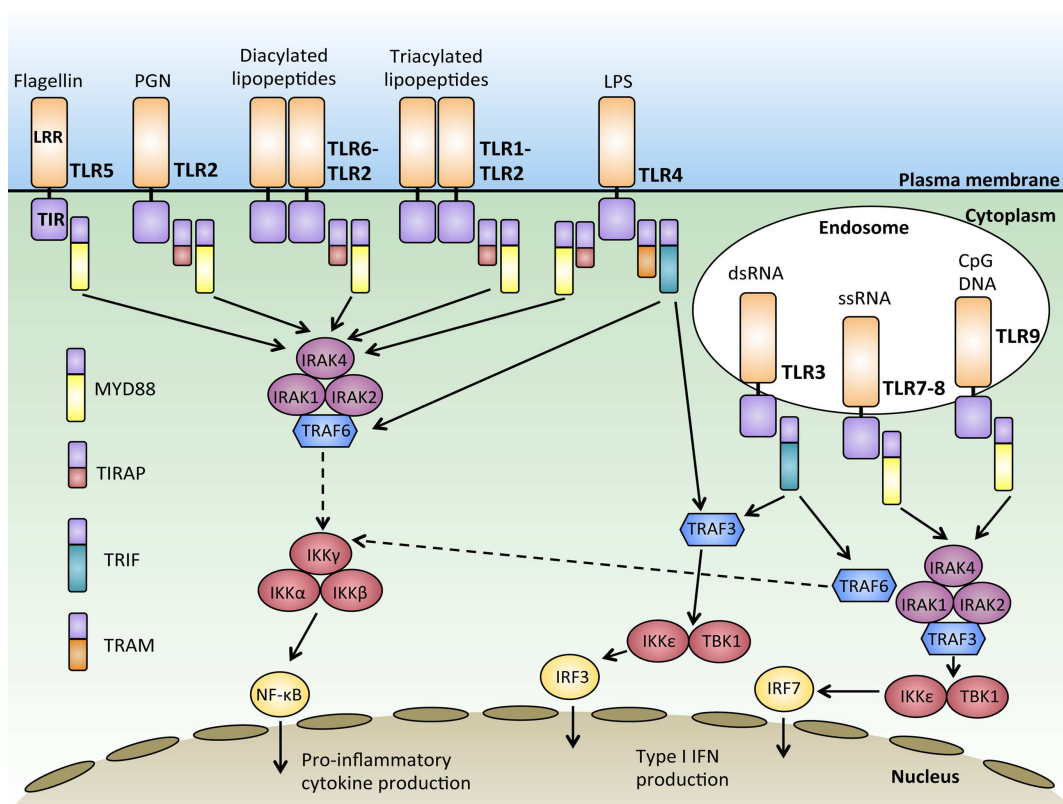


Figura 28. Esquema de la activación de vías de señalización dependientes e independientes de *MYD88*. Tomado de Front Immunol 2014 (Wang JQ *et al*, 2014).

La importancia clínico-patológica del gen *MYD88* y la mutación L265P en los LDCGB sigue siendo difícil de definir, aunque existen publicaciones que evidencian una clara asociación de la presencia de esta mutación con un empeoramiento en el pronóstico y respuesta de la enfermedad a los tratamientos (Fernández-Rodríguez C *et al*, 2014). Con el objetivo de aclarar este punto, recientemente se ha realizado un metanálisis que incluyó 40 estudios con 2736 pacientes con LDCGB y cuyos resultados demuestran que la incidencia global de la mutación L265P es del 16,5 % en los LDCGB; sin embargo, esta frecuencia mutacional se eleva exponencialmente en los casos de linfomas extraganglionares tipo linfoma cerebral y testicular primario, donde llega a ser del 60 % y 77 % respectivamente. Curiosamente, la mutación L265P de *MYD88* se detectó más frecuentemente en los LDCGB de tipo ABC que en los GCB y se asoció significativamente a un impacto negativo en SG, pero no al estadio clínico de la enfermedad (Lee JH *et al*, 2017). Estos resultados son concordantes con los reportados en una serie de 42 pacientes diagnosticados de linfomas primarios del SNC en pacientes sin infección por VIH, de los cuales el 67 % tuvieron mutaciones en *MYD88* y en el análisis de supervivencia se demuestra que la mutación L265P se asocia con mal pronóstico y alto riesgo de progresión de la enfermedad (Hattori K *et al*, 2017).

Las cuatro mutaciones encontradas en *CD79B* (un caso mostrando 2 mutaciones) se encuentran en los exones 5 y 6 que afectan al dominio ITAM (aa 185-213). Dos de ellos afectaron a la tirosina Y196 que también se demostró ser una mutación de ganancia de función que participa en la activación de la vía NFκB (Ngo VN *et al*, 2011; Kim Y *et al*, 2014). En 2016 se publicó el primer estudio molecular dirigido en pacientes con LPM (Taniguchi K *et al* 2016), donde se analizó la frecuencia de mutaciones en *MYD88* y *CD79B* en un grupo de 48 pacientes. Veintiocho de las 48 pacientes cumplían con los criterios diagnósticos de LPM de Wiseman y Liao, mientras que las 18 restantes, si bien tenían afectación mamaria, también tenían afectación ganglionar sistémica u otros sitios extraganglionares (ovarios, sistema nervioso central, médula ósea y bazo). Los resultados de este estudio muestran frecuencias de mutaciones del 58 % para L265P-*MYD88*, y 33 % para *CD79B*. En contraste, nuestros resultados muestran una frecuencia mutacional de 39 % y 17 % respectivamente. Estas frecuencias más altas en la serie de Taniguchi podrían deberse a la mayor sensibilidad de la técnica que utilizaron (PCR digital) y / o pueden reflejar diferencias en la prevalencia de factores etiológicos en cohortes española y japonesa. Recientemente, se ha reportado un estudio realizado en

población china que analiza la frecuencia de mutaciones de *MYD88* y *CD79B* en 19 mujeres afectas por LDCGB de origen ginecológico (7 corresponden a LDCGB-PM y 12 casos a linfomas primarios de ovario, útero y/o cérvix). Los resultados revelan que un 57,9 % de los pacientes presentaron mutaciones en *MYD88*, de las cuales 10 correspondieron a la mutación L265P y 1 caso a la mutación L265S; es decir, el 63 % de los casos mutados (7) son LDCGB-PM de los que 6 tuvieron la mutación L265P, mientras que solo siete pacientes (36,8 %) albergaron una mutación *CD79B* (2 Y196H, 2 Y196N, 1 Y196D, 1 Y196F y 1 Y196X). Solo 2 de las 7 pacientes con LDCGB-PM mostraron mutaciones en ambos genes (Cao XX *et al*, 2017). Estos resultados, dado el pequeño número de pacientes, no permite llegar a conclusiones sólidas sobre el impacto de estas mutaciones en la evolución de los pacientes, ni en la supervivencia y es posible que las diferencias en frecuencia de las mutaciones respecto a nuestro grupo, tengan las mismas explicaciones de las que creemos se dan con el caso del grupo japonés.

PRDM1: Conocido también como gen de la Proteína de Maduración Inducida por los Linfocitos B (*BLIMP1*), *PRDM1* es un importante regulador de la diferenciación de las células plasmáticas y se encuentra inactivado con frecuencia en LDCGB tipo ABC, como resultado de deleciones o mutaciones (Tam W *et al*, 2006; Pasqualucci L *et al*, 2006). *PRDM1* codifica dos isoformas principales denominadas BLIMP1 α y BLIMP1 β . La primera de estas isoformas es la responsable de la diferenciación de las células plasmáticas y se considera un gen supresor de tumores en neoplasias hematológicas, principalmente linfomas B y T (Karube K *et al*, 2011; Mandelbaum J *et al*, 2010; Calado DP *et al*, 2010). Por su parte, la isoforma β se ve sobreexpresada en mielomas múltiples y en algunos linfomas de células T, pero no en LDCGB tipo ABC (Shapiro-Shelef M *et al*, 2003; Liu YY *et al*, 2007; Ocaña E *et al*, 2006). Los estudios han demostrado que las mutaciones de inactivación de *PRDM1* son recurrentes hasta en aproximadamente un 25 % de los casos LDCGB tipo ABC, lo cual condiciona una sobreexpresión de Myc y una disminución de la expresión de moléculas supresoras de tumores de la vía p53 condicionando un peor pronóstico y respuesta al tratamiento, así como una menor supervivencia (Xia Y *et al*, 2016).

Otro de los genes mutados es *CARD11* (también conocido como *CARMA1*), el cual se encuentra mutado en el 17 % de nuestros pacientes y cuyas mutaciones afectan los

dominios coiled-coil que median la oligomerización de CARD11 y la subsecuente activación de la vía NF- κ B en los LDCGB de tipo ABC (Davis RE *et al*, 2008; Lenz G *et al*, 2008). Varios estudios han demostrado que las mutaciones en CARD11 tienen un papel importante en la linfomagenesis de linfomas tanto B como T, agresivos e indolentes (Compagno M *et al*, 2009; Pasqualucci L *et al*, 2011; Juilland M & Thome M, 2016) y su rol patogénico puede ser independiente como el descrito previamente, por regulación del BRC dependiente de *CD79a* y *CD79b* o bien por acción del complejo multimérico CARD11 / BCL10 / MALT1 (CBM), compuesto por la proteína producto CARD11, la proteína adaptadora BCL10 y la proteasa MALT1, el cual juega un importante papel en la transmisión de señales después de la estimulación del receptor antigénico. Esta potencial estimulación antigénica puede generar un cambio conformacional en CARD11 permitiendo que el CBM active de forma continua factores de transcripción NF κ B y AP-1, con la consecuente alteración en el control de la proliferación de linfocitos, la diferenciación y la supervivencia celular (Juilland M & Thome M, 2016).

Seguidamente, tenemos las mutaciones en *KMT2D*, *TNFAIP3* y *CREBBP* que se presentaron en el 11 % de los pacientes. Los estudios sobre alteraciones en el gen *KMT2D* (también denominado *MLL2* o *MLL4*) demuestran que este es uno de los genes más frecuentemente mutados en linfomas B, principalmente en LF (89 %) y LDCGB (32 % en muestras de tumor y 59 % en líneas celulares) (Morin RD *et al*, 2011) y se ha demostrado que en condiciones normales, es un gen con función supresora de tumores en el centro germinal de las células B (Ortega-Molina A *et al*, 2015; Zhang J *et al*, 2015). La metiltransferasa H3K4 *KMT2D* controla la expresión de múltiples reguladores claves de las vías de señalización de los receptores de células CD40, TLR y BCR. En general, podemos decir que los datos sugieren que las mutaciones somáticas de *KMT2D* pueden impulsar la expansión del centro germinal debido a la proliferación aumentada y deterioro de la diferenciación terminal celular determinada por la pérdida de metilación de H3K4 (Lee JE *et al*, 2013). Por tanto, las mutaciones de este gen constituye alteraciones tempranas en linfomas de origen en el centro germinal, siendo en su mayoría mutaciones inactivadoras, lo que sugiere que puede comportarse como un gen supresor tumoral (Morin RD *et al*, 2011); sin embargo, no se ha demostrado que tengan impacto alguno en la respuesta a tratamientos de quimioterapia como el R-CHOP en el LDCGB.

Está demostrado que la delección de la banda cromosómica 6q es una de las alteraciones genómicas más comunes en pacientes con LNH, dado que cubre regiones de genes responsables de la oncogénesis. Entre estos genes tenemos el gen del factor de necrosis tumoral alfa inducido por la proteína 3 o *TNFAIP3* (también conocido como *A20*), que es un gen de 16.998 bases que se encuentra en la banda citogenética 6q23.3 y es conocido por regular negativamente NFκB, actuando por tanto como un gen supresor de tumores y regulador de la respuesta inmune. Actualmente se sigue investigando sobre el verdadero papel de *A20* en la linfomagénesis, así como si su inactivación mono o bialélica es por si misma suficiente para inducir una activación constitutiva de la vía NFκB (Honma K *et al*, 2009). Existen varios estudios que demuestran la asociación de mutaciones de *TNFAIP3* en pacientes con LDCGB tipo ABC (Kato M *et al*, 2009; Schmitz R *et al*, 2009); sin embargo, ninguno de ellos ha podido revelar el valor pronóstico de estas y su impacto en la supervivencia de los pacientes (Paik JH *et al*, 2013; Cen H *et al*, 2015). Solo hemos identificado un estudio que incluye linfomas de origen extraganglionar y reporta en estos una frecuencia del 6,25 % de mutaciones en pacientes con primarios cerebrales y testiculares (Cao Y *et al*, 2016).

En relación a las mutaciones en *CREBBP* que en nuestra serie fue del 11 %, vemos que los estudios realizados en linfomas de origen ganglionar están en torno al 39 % y son más frecuentes en LDCGB de GCB (Pasqualucci L *et al*, 2011). Se ha demostrado que este gen actúa como supresor de tumores y por tanto, la pérdida de uno de sus alelos puede conducir a una reducción de la acetilación e inactivación de TP53 y una regulación positiva de BCL6, así como una disminución de las Histona H3 lisina 14 (H3K14), K18 y acetilación de K27, con una reducción de la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II con la consecuente disminución de proliferación de células T que conduce a la evasión inmune del tumor (Lunning MA *et al*, 2015). En un estudio realizado en 84 pacientes con LDCGB-GCB, se ha confirmado que existe una relación directa entre las mutaciones en *CREBBP*, principalmente las que comprometen el dominio acetiltransferasa y un empeoramiento en las tasas de SLP y SG (Juskevicius D *et al*, 2017).

A continuación, revisamos de forma breve las características y relación con el LDCGB de otros genes que hemos encontrado mutados en al menos un caso como es el caso de *STAT3*, *TCF3*, *PLCG2*, *CCND3*, *ATM* y *BRAF*.

STAT3 (Signal Transducer And Activator Of Transcription 3) es un gen perteneciente a la familia STAT de factores de transcripción, ubicado en el cromosoma 17 (17q21.2) y que forman parte de la cascada de la vía de señalización de JAK/STAT. En respuesta a citoquinas y factores de crecimiento (IFN, EGF, IL5, IL6, HGF, LIF y BMP2), los miembros de la familia STAT son fosforilados por el receptor asociado a quinasas para formar homo o heterodímeros que se translocan al núcleo de la célula donde actúan como activadores de la transcripción, constituyéndose por tanto en proteínas clave en procesos celulares tales como el crecimiento celular y la apoptosis (Yu H *et al*, 2007; Yu H *et al*, 2009). Las mutaciones en *STAT3* se han asociado con diversas enfermedades autoinmunes multisistémicas y al síndrome de hiperinmunoglobulina E, demostrándose también una activación persistente en diversas neoplasias entre ellas el LDCGB (Ding BB *et al*, 2008), donde parece asociarse a un empeoramiento en la supervivencia, especialmente en pacientes con subtipo ABC tratados con R-CHOP (Huang X *et al*, 2013) aunque otros en los resultados de otros grupos no se reproduzcan estos datos (Gupta M *et al*, 2012).

TCF3 (Transcription Factor 3): Este gen de 43.316 bases, ubicado en el cromosoma 19 (19p13.3) y conocido también como *E2A*, codifica un miembro de la familia de la proteína E (clase I) de los factores de transcripción helix-loop-helix, la cual activa la transcripción uniéndose a secuencias reguladoras de E-box en genes diana como heterodímeros u homodímeros. Estas proteínas E juegan un papel crítico en la linfopoyesis y la proteína codificada es necesaria para el desarrollo de linfocitos B y T. La delección de este gen o la disminución de la actividad de la proteína codificada pueden desempeñar un papel en las neoplasias linfoides entre ellas el LH y algunas leucemias agudas (Steininger A *et al*, 2011). Estudios en líneas celulares de LH han demostrado que la sobreexpresión de *TCF3* modula la expresión de múltiples genes pro-apoptóticos incluyendo *BIK*, *APAF1*, *FASLG*, *BOK* y *TNFRSF10A / DR4* y es posible que mutaciones en este gen condicionen una desregulación de este mecanismo de control celular y estar por tanto así implicado en la oncogénesis de LH clásico (Guan H *et al*, 2016).

PLCG2 (Phospholipase C Gamma 2): Este gen se encuentra en el cromosoma 16q23.3 y codifica una proteína que funciona como una enzima de señalización transmembrana, la cual es importante en la conversión catalítica de 1-fosfatidil-1D-mio-inositol 4, 5-bisfosfato a 1D-mio-inositol 1, 4, 5-trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG), usando calcio como cofactor. Tanto el IP3 como el DAG actúan como segundos mensajeros importantes en la transmisión de señales de receptores de factores de crecimiento y receptores del sistema inmune a través de la membrana celular. Las mutaciones en este gen se han asociado a enfermedades autoinmunes, así como enfermedades neoplásicas. Las mutaciones en el gen que codifica la tirosina quinasa de Bruton (BTK) interfieren con la proliferación de células B y conducen a una inmunodeficiencia ligada a X en ratones caracterizados por un número reducido de células B. Estudios recientes han demostrado la tirosina quinasa de Bruton (BTK) transmite señales del BCR al factor de transcripción NFκB, que a su vez reprograma un conjunto de genes necesarios para el crecimiento normal de células B. La inducción de esta vía de señalización requiere la acción intermedia de la PLCG2, un sustrato de fosforilación potencial de BTK. En este contexto, se encuentra un teórico papel de este gen en la patogénesis de algunas enfermedades neoplásicas y su asociación con resistencias a tratamientos y progresión de la enfermedad en el caso de la leucemia linfocítica crónica (Petro JB & Khan, 2001; Maddocks KJ *et al*, 2015).

CCND3 (Ciclina D): La proteína codificada por este gen pertenece a una familia de ciclinas muy conservadas y que funcionan como reguladores de quinasas dependientes de ciclinas o CDKs. La ciclina D3 actúa como subunidad reguladora de un complejo formado con CDK4 o CDK6 cuya actividad es necesaria para la transición G1/S del ciclo celular y está implicada en la fosforilación de la proteína supresora de tumores Rb. Diversos estudios demuestran que la ciclina D3 tiene una función clave en el desarrollo de células B mediante la integración de citoquinas y reorganización de las Ig. Mutaciones en *CCND3* han sido previamente descritas en enfermedades hematológicas malignas como el linfoma de Burkitt, el LDCGB, el LF y el linfoma inclasificable esplénico (Cooper AB *et al*, 2006; Pasqualucci L *et al*, 2011; Curiel-Olmo S *et al*, 2017). Igualmente, en estudios de pacientes con LF transformados se ha identificado como uno de los genes más frecuentemente mutados, aunque no se conoce claramente su papel en este proceso, se cree podría estar asociado a eventos

genéticos con capacidad de modificar el efecto de eventos fundadores tales como la translocación t(14:18) (Kridel R *et al*, 2016).

ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated): Es un gen localizado en el cromosoma 11q22.3, que codifica una proteína quinasa implicada en la regulación de la división celular y la reparación de diferentes daños en la estructura del ADN mediante la fosforilación de TP53. Las mutaciones en este gen, son causantes de la enfermedad denominada Ataxia telangiectasia de la que toma su nombre y se ha demostrado también estar relacionado con algunas neoplasias hematológicas (Gumy-Pause F *et al*, 2004). Estudios en pacientes con leucemia linfocítica crónica demuestran que alrededor del 20-40 % de los casos con la delección 11q presentan mutaciones en *ATM*, teniendo un claro impacto negativo en términos de supervivencia y respuesta a tratamientos la inactivación bialélica de este gen tanto en pacientes con diagnóstico de novo como en pacientes previamente tratados (Skowronska A *et al*, 2012; Lozano-Santos C *et al*, 2017).

BRAF: Este gen de 208.814 bases, ubicado en el cromosoma 7q34 codifica una proteína perteneciente a la familia raf / mil de proteína quinasa tipo serina / treonina que desempeña un papel en la regulación de la vía de señalización MAP quinasa / ERKs, que afecta a la división y diferenciación celular. Las mutaciones en este gen se asocian a patologías oncológicas como el cáncer colorrectal, melanoma maligno, el carcinoma de tiroides, carcinoma de pulmón de células no pequeñas y adenocarcinoma de pulmón, así como también a neoplasias hematológicas como el LNH aunque en estos últimos la frecuencia es baja, con un rango de presentación entre el 0,5 y el 4,6 % (Cao Y *et al*, 2016; Dubois S *et al*, 2016). Un caso particular es el de la leucemia de células peludas, en la que en el 100 % los casos se demuestran la presencia de la mutación V600E en la serina / treonina quinasa de BRAF (una isoforma de RAF) que conduce a la activación constitutiva de la vía de señalización RAF-MEK-ERK y por tanto perpetúa la supervivencia de la célula tumoral (Tiacchi E *et al*, 2011; Arcaini L *et al*, 2012).

En resumen, los resultados de nuestro estudio muestran que en el LDCGB-PM los 5 genes más frecuentemente mutados son *PIMI*, *MYD88*, *CD79B*, *PRDM1* y *CARD11*, los cuales son determinantes en la activación constitutiva de vías de señalización como NFκB y JAK/STAT y por tanto nos sugiere que estas pueden ser relevantes en la fisiopatología de esta enfermedad. Estos genes está demostrado que se encuentran

también frecuentemente mutados en los LDCGB primarios ganglionares tipo non-GCB (Figura 28), lo puede tener implicaciones pronósticas al determinar un curso evolutivo distinto de la enfermedad como se ha reportado en publicaciones anteriores tanto en linfomas de origen ganglionar como extraganglionar y cuyos mecanismos de acción han sido descritos previamente (Chea C *et al*, 2014; Davis RE *et al*, 2010; Basso K *et al*, 2015). Los resultados obtenidos en nuestro estudio son consistentes y apoyan los datos descritos en los únicos dos estudios publicados hasta la fecha de secuenciación en pacientes con LDCGB-PM realizados en población oriental, siendo por tanto este trabajo el primero en su genero llevado a cabo en población europea.

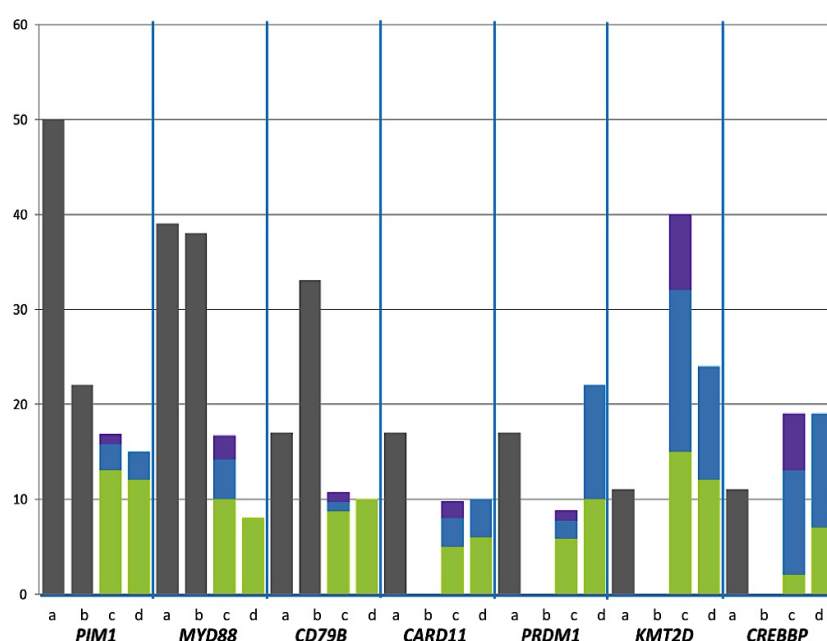


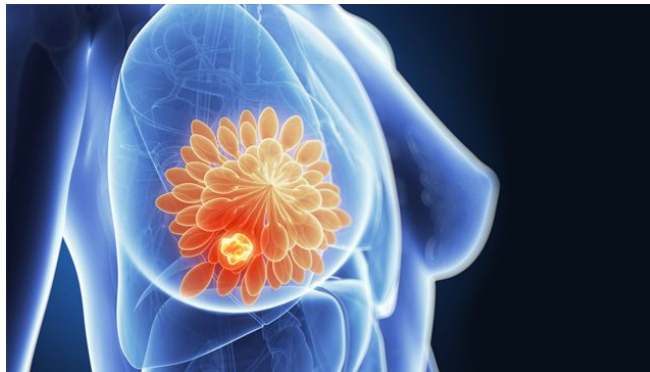
Figura 29. Comparación de resultados de frecuencias mutacionales entre nuestros resultados y series publicadas previamente. (a) Franco F, 2017; (b) Bruno A, 2014; (c) Dubois S, 2016; (d) Pasqualucci L, 2011.

Adicionalmente, debemos destacar que en nuestro estudio, el análisis realizado de los resultados del estudio de IHQ y el molecular, no hemos encontrado una asociación clara entre estos genes mutados con la COO determinada por IHQ. Varios estudios previos muestran que la clasificación de COO, utilizando el método de Hans, sólo tiene ~ 80 % de concordancia con la de los perfiles de expresión génica y es por ello que consideramos que los estudios e IHQ pueden ser insuficientes para una correcta clasificación y determinación de grupos pronósticos que en el futuro tengan implicaciones terapéuticas para nuestros pacientes (Zhang J *et al*, 2013). Finalmente, la presencia de mutaciones en *MYD88*, *CD79B* y *PIM1* sugiere que existen nuevas

oportunidades terapéuticas a explorar en pacientes con LDCGB-PM con fármacos como la lenalidomida, inhibidores de BCR o NFκB o inhibidores de PIM1.

A pesar de que paulatinamente se ha incrementado el conocimiento sobre esta rara patología, la mayor parte de los estudios de LPM se limitan a descripciones clínicas que claramente son insuficientes para entender y predecir la evolución de la enfermedad. Es por ello que consideramos que nuestro aporte a este conocimiento científico es importante, ya que aborda no solo el ámbito clínico, sino también molecular de la enfermedad, siendo necesario ampliar este último aspecto con nuevos estudios y mayor número de pacientes para que su validez sea más consistente, lo cual requerirá de la colaboración de grupos corporativos onco-hematológicos nacionales e internacionales.

CONCLUSIONES



1. No existen factores clínicos pronósticos que permitan estratificar a los pacientes con linfoma primario de mama en grupos de riesgo.
2. El uso de antraciclinas como parte del esquema de tratamiento de primera línea del linfoma primario de mama mejora la supervivencia libre de progresión y la supervivencia global a 5 años.
3. La radioterapia puede considerarse como tratamiento exclusivo en pacientes seleccionados con linfoma primario de mama indolente.
4. La determinación de la célula de origen en el linfoma difuso de célula grande B primario de mama muestra que en esta es heterogénea, siendo el más frecuente en nuestra serie el subtipo GCB.
5. El índice de proliferación celular medido con el Ki67 mayor del 90 % podría constituir un factor pronóstico independiente de recaída.
6. Los genes mutados en esta serie de linfoma difuso de célula grande B primario de mama son *PIMI*, *MYD88*, *KMT2D*, *CARD11*, *CD79B*, *PRDM1*, *ATM*, *BRAF*, *CREBBP*, *TNFAIP3*, *CCND3*, *PLCG2*, *TCF3* y *STAT3*.
7. Existe una frecuencia especialmente alta para *PIMI*, *MYD88*, *CD79B*, *PRDM1* y *CARD11*, lo que sugiere que la activación de la vía constitutiva NFκB puede ser importante en la patogénesis del linfoma difuso de célula grande B primario de mama y deberían ser considerados potenciales dianas terapéuticas a explorar en futuros ensayos clínicos.
8. La alta frecuencia de mutaciones en *PIMI*, probablemente determinadas al menos en parte, por el fenómeno de hipermutación somática aberrante es el hallazgo más relevante en pacientes con linfoma difuso de célula grande B primario de mama.

BIBLIOGRAFÍA

1. Advani R, Rosenberg SA, Horning SJ. Stage I and II follicular non-Hodgkin's lymphoma: long-term follow-up of no initial therapy. *J Clin Oncol*. 2004;22(8):1454.
2. Alizadeh A, Eisen MB, Davis RE et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*. 2000;403(6769):503–511.
3. Arcaini L, Zibellini S, Boveri E, et al. The BRAF V600E mutation in hairy cell leukemia and other mature B-cell neoplasms. *Blood*. 2012;119(1):188-191.
4. Au WY, Chan AC, Chow LW, Liang R. Lymphoma of the breast in Hong Kong Chinese. *Hematol Oncol*. 1997;15(1):33–8.
5. Avenia N, Sanguinetti A, Cirocchi R, et al. Primary breast lymphomas: a multicentric experience. *World J Surg Oncol*. 2010;8:53.
6. Avilés A, Delgado S, Nambo MJ, Neri N, Murillo E, Cleto S. Primary breast lymphoma: Results of a controlled clinical trial. *Oncology*. 2005;69(3):256-260.
7. Avilés A, Castañeda C, Neri N, Cleto S and Nambo MJ. Rituximab and dose dense chemotherapy in primary breast lymphoma. *Haematologica*. 2007;92(8):1147-8.
8. Aviv A, Tadmor T, Polliack A. Primary diffuse large B-cell lymphoma of the breast: looking at pathogenesis, clinical issues and therapeutic options. *Ann Oncol*. 2013;24(9):2236–44.
9. Baimpa E, Dahabreh IJ, Voulgarelis M, Moutsopoulos HM. Hematologic manifestations and predictors of lymphoma development in primary Sjögren syndrome: clinical and pathophysiologic aspects. *Medicine (Baltimore)*. 2009;88(5):284-93.
10. Barrans S, Crouch S, Smith A, et al. Rearrangement of MYC is associated with poor prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the era of rituximab. *J Clin Oncol*. 2010;28(20):3360-3365.
11. Basso K and Dalla-Favera R. Germinal centres and B cell lymphomagenesis. *Nat Rev Immunol* 2015; 15(3):172-184.

12. Bea S, Zettl A, Wright G, et al. Diffuse large B-cell lymphoma subgroups have distinct genetic profiles that influence tumor biology and improve gene-expression-based survival prediction. *Blood*. 2005;106(9):3183-3190.
13. Bizjak M, Selmi C, Praprotnik S, Bruck O, et al. Silicone implants and lymphoma: The role of inflammation. *J Autoimmun*. 2015;65:64.
14. Blombery P, Thompson ER, Jones K, et al. Whole exome sequencing reveals activating JAK1 and STAT3 mutations in breast implant-associated anaplastic large cell lymphoma anaplastic large cell lymphoma. *Haematologica*. 2016;101(9):e387.
15. Bouska A, Zhang W, Gong Q, et al. Combined copy number and mutation analysis identifies oncogenic pathways associated with transformation of follicular lymphoma. *Leukemia*. 2017;31(1):83-91.
16. Brasó-Maristany F, Filosto S, Catchpole S, et al. PIM1 kinase regulates cell death, tumor growth and chemotherapy response revealing a novel target in triple-negative breast cancer. *Nat Med*. 2017;22(11):1303-1313.
17. Brault L, Menter T, Obermann E, et al. PIM kinases are progression markers and emerging therapeutic targets in diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Cancer*. 2012;107(3):491–500.
18. Bruno A, Boisselier B, Labreche K, et al. Mutational analysis of primary central nervous system lymphoma. *Oncotarget*. 2014;5(13):5065-5075.
19. Calado DP, Zhang B, Srinivasan L, et al. Constitutive canonical NF-kappaB activation cooperates with disruption of BLIMP1 in the pathogenesis of activated B cell-like diffuse large cell lymphoma. *Cancer Cell* 2010;18:580-589.
20. Cao Y, Zhu T, Zhang P, et al. Mutations or copy number losses of CD58 and TP53 genes in diffuse large B cell lymphoma are independent unfavorable prognostic factors. *Oncotarget*. 2016; 7(50):83294-83307.
21. Cao XX, Li J, Cai H, Zhang, Duan MH and Zhou DB. Patients with primary breast and primary female genital tract diffuse large B cell lymphoma have a high frequency of MYD88 and CD79B mutations. *Ann Hematol*. 2017.
22. Caon J, Wai E, Hart J et al. Treatment and Outcomes of Primary Breast Lymphoma. *Clinical Breast Cancer*. 2012;12:412-9.
23. Capello D, Vitolo U, Pasqualucci L, et al. Distribution and pattern of BCL-6 mutations throughout the spectrum of B-cell neoplasia. *Blood*. 2000;95(2):651-9.

24. Carde P, Hagenbeek A, Hayat M, et al. Clinical staging versus laparotomy and combined modality with MOPP versus ABVD in early-stage Hodgkin's disease: the H6 twin randomized trials from the European Organization for Research and Treatment of Cancer Lymphoma Cooperative Group. *J Clin Oncol*. 1993;11(11):2258.
25. Cen H, Tan X and Guo B. A20 Mutation Is Not a Prognostic Marker for Activated B-Cell-Like Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *PLoS One*. 2015;10(12):e0145037.
26. Cheah CY, Campbell BA, Seymour JF. Primary breast lymphoma. *Cancer Treat Rev*. 2014;40(8):900–8.
27. Cho U, Oh WJ, Hong YK and Lee YS. Prognostic Significance of High Ki-67 Index and Histogenetic Subclassification in Primary Central Nervous System Lymphoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2016.
28. Cibull TL, Jones TD, Li L, et al. Overexpression of Pim-1 during progression of prostatic adenocarcinoma. *J Clin Pathol*. 2006;59:285–288.
29. Compagno M, Lim WK, Grunn A, et al. Mutations of multiple genes cause deregulation of NF-kappaB in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature*. 2009;459(7247):717-721.
30. Cooper AB, Sawai CM, Sicinska E, et al. A unique function for cyclin D3 in early B cell development. *Nat Immunol*. 2006;7(5):489-497.
31. Curiel-Olmo S, Mondejar R, Almaraz C, et al. Splenic diffuse red pulp small B-cell lymphoma displays increased expression of cyclin D3 and recurrent CCND3 mutations. *Blood*. 2017;129(8):1042-1045.
32. D'Amore F, Christensen B, Brincker H, et al. Clinico-pathological features and prognostic factors in extranodal non-Hodgkin lymphomas. Danish LYFO Study Group. *Eur J Cancer*. 1991;27(10):1201-8.
33. Dawson I, Cornes J, Morson B. Primary malignant lymphoid tumours of the intestinal tract. Report of 37 cases with a study of factors influencing prognosis. *Br J Surg*. 1961;49:80–9.
34. Davis RE, Ngo VN, Lenz G, et al. Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature*. 2010;463(7277):88-92.
35. Deutsch A, Aigelsreiter A, Beham-Schmid C, Beham A, Linkesch W, Neumeister P. Aberrant somatic hypermutation in extranodal marginal zone B-cell lymphoma of MALT type. *Blood*. 2005;106:125a–6a. Abstr 417.

36. Ding BB, Yu JJ, Yu RY, et al. Constitutively activated STAT3 promotes cell proliferation and survival in the activated B-cell subtype of diffuse large B-cell lymphomas. *Blood*. 2008;111:1515–1523.
37. Domchek SM, Hecht JL, Fleming MD, Pinkus GS, Canellos GP. Lymphomas of the breast: Primary and secondary involvement. *Cancer*. 2002;94(1):6–13.
38. Doshi KA, Trotta R, Natarajan K, et al. Pim kinase inhibition sensitizes FLT3-ITD acute myeloid leukemia cells to topoisomerase 2 inhibitors through increased DNA damage and oxidative stress. *Oncotarget*. 2016;7(30):48280-48295.
39. Dubois S, Viailly PJ, Mareschal S, et al. Next-Generation Sequencing in Diffuse Large B-Cell Lymphoma Highlights Molecular Divergence and Therapeutic Opportunities: a LYSA Study. *Clin Cancer Res*. 2016; 22(12): 2919-2928.
40. Fernández-Rodríguez C, Bellosillo B, García-García Met al. MYD88 (L265P) mutation is an independent prognostic factor for outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia*. 2014;28:2104–2106.
41. Fruchart C, Denoux Y, Chasle J, et al. High grade primary breast lymphoma: is it a different clinical entity?. *Breast Cancer Res Treat*. 2005;93(3):191-8.
42. Fukuhara S, Watanabe T, Munakata W, et al. Bulky disease has an impact on outcomes in primary diffuse large B-cell lymphoma of the breast: a retrospective analysis at a single institution. *Eur J Haematol*. 2011;87(5):434–40.
43. Ganjoo K, Advani R, Mariappan MR, McMillan A, Horning S. Non-Hodgkin lymphoma of the breast. *Cancer*. 2007;110:25–30.
44. George EV, Pharm J, Houston C, et al. Breast implant-associated ALK-negative anaplastic large cell lymphoma: a case report and discussion of possible pathogenesis. *Int J Clin Exp Pathol*. 2013;6(8):1631-42.
45. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol*. 1984;133:1710-1715.
46. Gerdes J, Li L, Schlueter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Gerlach C. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am J Pathol*. 1991;138:867-873.

47. Gisselbrecht C, Glass B, Mounier N, et al. Salvage regimens with autologous transplantation for relapsed large B-cell lymphoma in the rituximab era. *J Clin Oncol*. 2010;28(27):4184-90.
48. Greaves M and Maley CC. Clonal evolution in cancer. *Nature*. 2012;481(7381):306-313.
49. Guan H, Xie L, Wirth T and Ushmorov A. Repression of TCF3/E2A contributes to Hodgkin lymphomagenesis. *Oncotarget*. 2016;7(24):36854–36864.
50. Gummy-Pause F, Wacker P and Sappino AP. ATM gene and lymphoid malignancies. *Leukemia*. 2004;18:238–242.
51. Guo HY, Zhao XM, Li J, Hu XC. Primary non-Hodgkin's lymphoma of the breast: eight-year follow-up experience. *Int J Hematol*. 2008;87(5):491–7.
52. Gupta M, Maurer MJ, Wellik LE, et al. Expression of Myc, but not pSTAT3, is an adverse prognostic factor for diffuse large B-cell lymphoma treated with epratuzumab/R-CHOP. *Blood*. 2012;120:4400–4406.
53. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood*. 2004;103:275-282.
54. Harris NL, Jaffe ES, Stein H, et al. A Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood*. 1994;84(5):1361–92.
55. Hattori K, Sakata-Yanagimoto M, Okoshi Y et al. MYD88 (L265P) mutation is associated with an unfavourable outcome of primary central nervous system lymphoma. *Br J Haematol*. 2017;177:492–494.
56. He S, Nakada D and Morrison SJ. Mechanisms of stem cell self-renewal. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2009;25:377-406.
57. He X, Chen Z, Fu T, et al. Ki-67 is a valuable prognostic predictor of lymphoma but its utility varies in lymphomasubtypes: evidence from a systematic meta-analysis. *BMC Cancer*. 2014;14:153.
58. Hellman S (2007). “Brief Consideration of Thomas Hodgkin and His Times”. In Hoppe RT, Mauch PT, Armitage JO, Diehl V, Weiss LM. *Hodgkin Lymphoma* (2nd ed). Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins. Pag. 3-6. ISBN 0-7817-6422-X.
59. Herrera AF, Mei M, Low L, Kim HT, Griffin GK, Song JY, et al. Relapsed or Refractory Double-Expressor and Double-Hit Lymphomas Have Inferior

- Progression-Free Survival After Autologous Stem-Cell Transplantation. *J Clin Oncol*. 2017 Jan;35(1):24-31.
60. Herrmann R, Panahon A, Barcos M, Walsh D, Stutzman L. Gastrointestinal involvement in non Hodgkin's lymphoma. *Cancer*. 1980;46:215-22.
61. Hodgkin T. On Some Morbid Appearances of the Absorbent Glands and Spleen. *Med Chir Trans*. 1832;17:68–114.
62. Honma K, Tsuzuki S, Nakagawa M, et al. TNFAIP3/A20 functions as a novel tumor suppressor gene in several subtypes of non-Hodgkin lymphomas. *Blood*. 2009;114(12):2467-75.
63. Horowitz NA, Benyamini N, Wohlfart K, Brenner B and Avivi I. Reproductive organ involvement in non-Hodgkin lymphoma during pregnancy: a systematic review. *Lancet Oncol* 2013;14:e275–82.
64. Huang X, Meng B, Iqbal J, et al. Activation of the STAT3 signaling pathway is associated with poor survival in diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *J Clin Oncol*. 2013;31:4520-8.
65. Husain A, Roberts D, Pro B, McLaughlin P and Esmaeli B. Meta-analyses of the association between *Chlamydia psittaci* and ocular adnexal lymphoma and the response of ocular adnexal lymphoma to antibiotics. *Cancer*. 2007;110(4):809.
66. Hosein PJ, Maragulia JC, Salzberg MP, et al. A multicentre study of primary breast diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era. *Br J Haematol*. 2014;165(3):358–63
67. Hugh JC, Jackson F, Hanson J and Poppema S. Primary breast lymphoma. An immunohistologic study of 20 new cases. *Cancer*. 1990;66:2602–11.
68. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Isaacson PG. Classification of lymphoid neoplasms: the microscope as a tool for disease discovery. *Blood*. 2008;112(12):4384-4399.
69. Jeanneret-Sozzi W, Taghian A, Epelbaum R, et al. Primary breast lymphoma: Patient profile, outcome and prognostic factors. A multicentre Rare Cancer Network study. *BMC Cancer*. 2008, 8:86.
70. Jennings WC, Baker RS, Murray SS, et al. Primary breast lymphoma: the role of mastectomy and the importance of lymph node status. *Ann Surg*. 2007;245(5):784-9.

71. Jonsson MV, Theander E, Jonsson R. Predictors for the development of non-Hodgkin lymphoma in primary Sjogren's syndrome. *Presse Med.* 2012;41(9):e511-6.
72. Juilland M and Thome M. Role of the CARMA1/BCL10/MALT1 complex in lymphoid malignancies. *Curr Opin Hematol.* 2016;23(4):402–409.
73. Jung SP, Kim M, Han KM, et al. Primary breast lymphoma: a single institution's experience. *J Korean Surg Soc.* 2013;84(5):267–272.
74. Juskevicius D, Jucker D, Klingbiel D, Mamot C, Dirnhofer S, Tzankov A. Mutations of CREBBP and SOCS1 are independent prognostic factors in diffuse large B celllymphoma: mutational analysis of the SAKK 38/07 prospective clinical trial cohort. *J Hematol Oncol.* 2017;10(1):70.
75. Karube K, Nakagawa M, Tsuzuki S, et al. Identification of FOXO3 and PRDM1 as tumor-suppressor gene candidates in NK-cell neoplasms by genomic and functional analyses. *Blood.* 2011;118:3195-3204.
76. Kato M, Sanada M, Kato I, et al. Frequent inactivation of A20 in B-cell lymphomas. *Nature.* 2009;459(7247):712–6.
77. Keech JA and Creech BJ: Anaplastic T-cell lymphoma in proximity to a saline-filled breast implant. *Plast Reconstr Surg.* 1997;100(2):554-555.
78. Khalbuss W, Villas B, Bakhshandeh M. Cytomorphology and immunophenotyping of Burkitt's lymphoma presenting as a breast mass. *Breast J.* 2006;12(2):177-8.
79. Kim Y, Ju H, Kim DH, et al. CD79B and MYD88 mutations in diffuse large B-cell lymphoma. *Hum Pathol.* 2014;45(3):556-64.
80. Kridel R, Chan FC, Mottok A, et al. Histological Transformation and Progression in Follicular Lymphoma: A Clonal Evolution Study. *PLoS Med.* 2016;13(12):e1002197.
81. Krol AD, le Cessie S, Snijder S, Kluin-Nelemans JC, Kluin PM, Noordijk EM. Primary extranodal non-Hodgkin's lymphoma (NHL): The impact of alternative definitions tested in the Comprehensive Cancer Centre West population-based NHL registry. *Ann Oncol.* 2003;14(1):131–9.
82. Kumar A, Mandiyan V, Suzuki Y, et al. Crystal structures of proto-oncogene kinase Pim1: a target of aberrant somatic hypermutations in diffuse large cell lymphoma. *J Mol Biol.* 2005;348(1):183-93.

83. Kuper Hommer MJ, Snijder S, Janssen-Heijnen ML, et al. Treatment and survival of 38 female breast lymphomas: a population-based study with clinical and pathological reviews. *Ann Hematol* (2003) 82:397–404.
84. Lechner MG, Lade S, Liebertz DJ, et al. Breast implant-associated, ALK-negative, T-cell, anaplastic, large-cell lymphoma: establishment and characterization of a model cell line (TLBR-1) for this newly emerging clinical entity. *Cancer* 2011;117:1478–89.
85. Lee JE, Wang C, Xu S, et al. H3K4 mono- and di-methyltransferase MLL4 is required for enhancer activation during cell differentiation. *eLife*. 2013;2:e01503.
86. Lee JH, Jeong H, Choi JW et al. Clinicopathologic significance of MYD88 L265P mutation in diffuse large B-cell lymphoma: a meta-analysis. *Sci Rep*. 2017;7(1):1785.
87. Lenz G, Davis RE, Ngo VN, et al. Oncogenic CARD11 mutations in human diffuse large B cell lymphoma. *Science*. 2008;319(5870):1676-9.
88. Lewin K, Ranchod M, Dorfman R. Lymphomas of the gastrointestinal tract: a study of 117 cases presenting with gastrointestinal disease. *Cancer*. 1978;42(2): 693-707.
89. Li D, Deng J, He H, et al. Primary breast diffuse large B-cell lymphoma shows an activated B-cell-like phenotype. *Ann Diagn Pathol*. 2012;16(5):335-43.
90. Li J, Peet G, Balzarano D et al. Novel NEMO/I κ B kinase and NF- κ B target genes at the pre-B to immature B cell transition. *J. Biol. Chem*. 2001;276(21):18579–18590.
91. Li YY, Popivanova BK, Nagai Y, Ishikura H, Fujii C, Mukaida N. Pim-3, a proto-oncogene with serine/threonine kinase activity, is aberrantly expressed in human pancreatic cancer and phosphorylates bad to block bad-mediated apoptosis in human pancreatic cancer cell lines. *Cancer Res*. 2006;66:6741–6747.
92. Li ZM, Huang JJ, Xia Y, et al. High Ki-67 expression in diffuse large B-cell lymphoma patients with non-germinal center subtype indicates limited survival benefit from R-CHOP therapy. *Eur J Haematol*. 2012;88(6):510-7.

93. Libra M, Capello D, Gloghini A, et al. Analysis of aberrant somatic hypermutation (SHM) in non-Hodgkin's lymphomas of patients with chronic HCV infection. *J Pathol.* 2005;206:87–91.
94. Lista F, Tutino R, Khan A and Ahmad J. Subglandular breast augmentation with textured, anatomic, cohesive silicone implants: a review of 440 consecutive patients. *Plast Reconstr Surg.* 2013;132(2):295-303.
95. Liu MT, Hsieh CY, Wang AY, et al. Primary Breast Lymphoma: A pooled analysis of prognostic factors and survival in 93 case. *Ann Saudi Med.* 2005;25(4):288-93.
96. Liu YY, Leboeuf C, Shi JY, et al. Rituximab plus CHOP (R-CHOP) overcomes PRDM1-associated resistance to chemotherapy in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood.* 2007;110:339-344.
97. Lozano-Santos C, García-Vela JA, Pérez-Sanz N, et al. Biallelic ATM alterations detected at diagnosis identify a subset of treatment-naïve chronic lymphocytic leukemia patients with reduced overall survival similar to patients with p53 deletion. *Leuk Lymphoma.* 2017;58(4):859-865.
98. Lunning MA and Green MR. Mutation of chromatin modifiers; an emerging hallmark of germinal center B-cell lymphomas. *Blood Cancer.* 2015;5(10):e361.
99. You CY, Yang SK, Choe DH, Lee BH, Kim KH. Mammographic and sonographic findings of primary breast lymphoma. *Clin Imaging.* 2007;31(4): 234–8.
100. Maddocks KJ, Ruppert AS, Lozanski G, et al. Etiology of Ibrutinib Therapy Discontinuation and Outcomes in Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia. *JAMA Oncol.* 2015;1(1):80-7.
101. Maloney DG, Smith B, Appelbaum FR, et al. The antitumor effect of monoclonal anti-CD20 (mAb) therapy includes direct anti-proliferative activity and induction of apoptosis in CD20 positive non-Hodgkin's lymphoma cell lines. *Blood.* 1996;88:637a.
102. Martinelli G, Ryan G, Seymour JF, Nassi L, Steffanoni S, Alietti A, et al. Primary follicular and marginal-zone lymphoma of the breast: clinical features, prognostic factors and outcome: a study by the International Extranodal Lymphoma Study Group. *Ann Oncol.* 2009;20(12):1993–9.

103. Mathers S, Rickers A, Bommert K. Anti CD20 and B-cell receptor-mediated apoptosis: Evidence for shared intracellular signalling pathways. *Cancer Res* 2000;60:7170-6.
104. Macdonald A, Campbell DG, Toth R, McLauchlan H, Hastie CJ and Arthur JS. Pim kinases phosphorylate multiple sites on Bad and promote 14-3-3 binding and dissociation from Bcl-XL. *BMC Cell Biol.* 2006;7:1.
105. Mandelbaum J, Bhagat G, Tang H, et al. BLIMP1 is a tumor suppressor gene frequently disrupted in activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma. *Cancer Cell.* 2010;18:568-579.
106. McHeyzer-Williams MB. Lymphocyte biology. En: Paul WE, editor. *Fundamental immunology.* 6^a ed. Londres: Lippincot Williams and Wilkins; 2008. p. 289-311.
107. Meyer PN, Fu K, Greiner TC, et al. Immunohistochemical methods for predicting cell of origin and survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab. *J Clin Oncol.* 2011;29(2):200-7.
108. Mikkers H, Nawijn M, Allen J, et al. Mice deficient for all PIM kinases display reduced body size and impaired responses to hematopoietic growth factors. *Mol Cell Biol.* 2004;24(13):6104-15.
109. Miller TP, Grogan TM, Dahlberg S, et al. Prognostic Significance of the Ki-67 -Associated Proliferative Antigen in Aggressive Non-Hodgkin's Lymphomas: A Prospective Southwest Oncology Group Trial. *Blood,* 1994;83(6):1460-1 466.
110. Miranda R, Aladily TL, Prince HM, Kanagal-Shamanna R, de Jong D, Fayad LE, et al. Breast implant-associated anaplastic large-cell lymphoma: long-term follow-up of 60 patients. *J Clin Oncol.* 2014;32(2):114-20.
111. Miura O, Miura Y, Nakamura N, et al. Induction of tyrosine phosphorylation of Vav and expression of Pim-1 correlates with Jak2-mediated growth signaling from the erythropoietin receptor. *Blood.* 1994;15;84(12):4135-41.
112. Mologni L, Magistroni V, Casuscelli F, Montemartini M and Gambacorti-Passerini C. The Novel PIM1 Inhibitor NMS-P645 Reverses PIM1-Dependent Effects on TMPRSS2/ERG Positive Prostate Cancer Cells And Shows Anti-Proliferative Activity in Combination with PI3K Inhibition. *J Cancer.* 2017;8(1):140–145.

113. Mondello P, Cuzzocrea S and Mian M. Pim kinases in hematological malignancies: where are we now and where are we going? *J Hematol Oncol.* 2014;10(7):95.
114. Montesinos-Rongen M, Brunn A, Bentink S, et al. Gene expression profiling suggests primary central nervous system lymphomas to be derived from a late germinal center B cell. *Leukemia.* 2008;22(2):400-405.
115. Morin RD, Johnson NA, Severson TM, et al. Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. *Nat Genet.* 2010;42(2):181-185.
116. Morin RD, Johnson NA, Severson TM, et al. Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. *Nat Genet.* 2010;42(2):181-185.
117. Nakamura T, Tateishi K, Niwa T, et al. Recurrent mutations of CD79B and MYD88 are the hallmark of primary central nervous system lymphomas. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2016; 42: 279–290.
118. Nara Y, Soomin A, Hae Y, et al. Cell-of-origin of diffuse large B-cell lymphomas determined by the Lymph2Cx assay: better prognostic indicator than Hans algorithm. *Oncotarget.* 2017;8(13):22014-22022.
119. Negahban S, Ahmadi N, Oryan A, Khojasteh HN, Aledavood A, Soleimanpour H, et al. Primary bilateral Burkitt lymphoma of the lactating breast: a case report and review of the literature. *Mol Diagn Ther.* 2010;14:243–50.
120. Ngo VN, Young RM, Schmitz R, et al. Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature.* 2011;470(7332):115-9.
121. Niitsu N, Okamoto M, Nakamine H and Hirano M. Clinicopathologic features and treatment outcome of primary breast diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Res.* 2008;32(12):1837–1841.
122. Nogai H, Dörken B, Lenz G. Pathogenesis of non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol.* 2011;29(14):1803-11.
123. Nomizu T, Tsuchiya A, Nemoto T, et al. Burkitt's lymphoma of the bilateral breasts presenting during lactation. *Gan No Rinsho.* 1986;32:1023–1027.

124. Nowakowski GS & Czuczman MS. ABC, GCB, and Double-Hit Diffuse Large B-Cell Lymphoma: Does Subtype Make a Difference in Therapy Selection? *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 2015:e449-57.
125. Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*. 1976;194(4260):23-28.
126. Ocaña E, González-García I, Gutiérrez NC et al. The expression of PRDI-BF1 beta isoform in multiple myeloma plasma cells. *Haematologica*. 2006;91:1579-1580.
127. Orciani M, Sorgentoni G, Torresetti M, Di Primio R, Di Benedetto G. MSCs and inflammation: new insights into the potential association between ALCL and breast implants. *Breast Cancer Res Treat*. 2016 Feb;156(1):65-72.
128. Ortega-Molina A, Boss IW, Canela A, , et al. The histone lysine methyltransferase KMT2D sustains a gene expression program that represses B cell lymphoma development. *Nature medicine*. 2015;21:1199-208.
129. Paik JH, Go H, Nam SJ, et al. Clinicopathologic implication of A20/TNFAIP3 deletion in diffuse large B-cell lymphoma: an analysis according to immunohistochemical subgroups and rituximab treatment. *Leukemia & lymphoma*. 2013;54(9):1934–41.
130. Pasqualucci L, Compagno M, Houldsworth J et al. Inactivation of the PRDM1/BLIMP1 gene in diffuse large B cell lymphoma. *J Exp Med*. 2006;203(2):311-317.
131. Pasqualucci L, Dominguez-Sola D, Chiarenza A, et al. Inactivating mutations of acetyltransferase genes in B-cell lymphoma. *Nature*. 2011;471:189–95.
132. Pasqualucci L, Trifonov V, Fabbri G, et al. Analysis of the coding genome of diffuse large B-cell lymphoma. *Nat Genet*. 2011;43:830–7.
133. Pavone V, Ricardi U, Luminari S, et al. ABVD plus radiotherapy versus EVE plus radiotherapy in unfavorable stage IA and IIA Hodgkin's lymphoma: results from an Intergruppo Italiano Linfomi randomized study. *Ann Oncol*. 2008;19:763-8.
134. Peñalver FJ, Sancho JM, de la Fuente A, et al. Guidelines for diagnosis, prevention and management of central nervous system involvement in diffuse large B-cell lymphoma patients by the Spanish Lymphoma Group (GELTAMO). *Haematol*. 2017; 102(2):235-245.

135. Peters TL, Li L, Tula-Sanchez AA, Pongtornpipat P, Schatz JH. Control of translational activation by PIM kinase in activated B-cell diffuse large B-cell lymphoma confers sensitivity to inhibition by PIM447. *Oncotarget*. 2016 Sep 27;7(39):63362-63373.
136. Petrich AM, Gandhi M, Jovanovic B, et al. Impact of induction regimen and stem cell transplantation on outcomes in double-hit lymphoma: a multicenter retrospective analysis. *Blood*. 2014;124(15):2354-61.
137. Petro JB, Khan WN. Phospholipase C-gamma 2 couples Bruton's tyrosine kinase to the NF-kappaB signaling pathway in B lymphocytes. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(3):1715–9.
138. Radkani P, Joshi D, Paramo JC and Mesko TW. Primary Breast Lymphoma 30 Years of Experience With Diagnosis and Treatment at a Single Medical Center. *JAMA Surg*. 2014;149(1):91-93.
139. Rajewsky K: Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature*. 1996;381:751-758.
140. Relander T, Johnson NA, Farinha P, Connors JM, Sehn LH and Gascoyne RD. Prognostic factors in follicular lymphoma. *J Clin Oncol*. 2010;28(17):2902-2913.
141. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001;414(6859):105–111.
142. Richter J, Schlesner M, Hoffmann S, et al; ICGC MMML-Seq Project. Recurrent mutation of the ID3 gene in Burkitt lymphoma identified by integrated genome, exome and transcriptome sequencing. *Nat Genet*. 2012;44(12):1316-1320.
143. Robinson JT, Helga T, Winckler W, et al. Integrative Genomics Viewer. *Nat Biotechnol*. 2011; 29(1): 24–26.
144. Roschewski M, Staudt LM, Wilson WH. Diffuse large B-cell lymphoma-treatment approaches in the molecular era. *Nat Rev Clin Oncol*. 2014;11(1):12–23.
145. Ryan G, Martinelli G, Kuper-Hommel M et al. Primary diffuse large B-cell lymphoma of the breast: prognostic factors and outcomes of a study by the International Extranodal Lymphoma Study Group. *Ann Oncol*. 2008;19:233–241.

146. Sabaté J, Gómez A, Torrubia S, et al. Lymphoma of the Breast : Clinical and Radiologic Features With Pathologic Correlation in 28 Patients. *Breast J.* 2002;8(5):294-304.
147. Sáez AI, Artiga MJ, Romero C, et al. Development of a real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay for c-myc expression that allows the identification of a subset of c-myc+ diffuse large B-cell lymphoma. *Lab Invest.* 2003;83(2):143-152.
148. Santra A, Kumar R, Reddy R et al. FDG PET-CT in the management of primary breast lymphoma. *Clin Nucl Med.* 2009;34(12):848–53.
149. Savage K, Slack G, Mottok A, et al. Impact of dual expression of MYC and BCL2 by immunohistochemistry on the risk of CNS relapse in DLBCL. *Blood.* 2016;127(18): 2182-2188.
150. Savvari P, Matsouka C, Barbaroussi D, Christoulas D, Nikitas N, Dimopoulos MA, et al. Burkitt's lymphoma in pregnancy with bilateral breast involvement: case report with review of the literature. *Onkologie.* 2010;33:461–464.
151. Schmitz R, Hansmann ML, Bohle V, et al. TNFAIP3 (A20) is a tumor suppressor gene in Hodgkin lymphoma and primary mediastinal B cell lymphoma. *The Journal of experimental medicine.* 2009;206(5):981–9.
152. Scott DW, Wright G, Williams P, et al. Determining cell-of-origin subtypes of diffuse large B-cell lymphoma using gene expression in formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Blood.* 2014;123(8):1214-1217.
153. Scott DW, Mottok A, Ennishi D, et al. Prognostic Significance of Diffuse Large B-Cell Lymphoma Cell of Origin Determined by Digital Gene Expression in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue Biopsies. *J Clin Oncol.* 2015;33(26):2848-56.
154. Selten G, Cuypers HT, Zijlstra M, Melief C and Berns A. Involvement of c-myc in MuLV-induced T cell lymphomas in mice: frequency and mechanisms of activation. *EMBO J.* 1984;3(13): 3215-22.
155. Shah N, Pang B, Yeoh KG, et al. Potential roles for the PIM1 kinase in human cancer - a molecular and therapeutic appraisal. *Eur J Cancer.* 2008;44(15):2144–2151.
156. Shapiro-Shelef M, Lin KI, McHeyzer-Williams LJ, et al . Blimp-1 is required for the formation of immunoglobulin secreting plasma cells and pre-

- plasma memory B cells. *Immunity* 2003;19:607–620.
157. Shome DK, George SM, Al-Hilli F, Satir AA. Spectrum of malignant lymphomas in Bahrain. Leitmotif of a regional pattern. *Saudi Med J*. 2004;25(2):164-7.
158. Skowronska A, Parker A, Ahmed G, et al. Biallelic ATM inactivation significantly reduces survival in patients treated on the United Kingdom Leukemia Research Fund Chronic Lymphocytic Leukemia 4 trial. *J Clin Oncol*. 2012;30:4524–4532.
159. Sousaris N, Barr G. Sonoelastography of Breast Lymphoma. *Ultrasound Quarterly*. 2016;00:1-4.
160. Stasik CJ, Nitta H, Zhang W, et al. Increased MYC gene copy number correlates with increased mRNA levels in diffuse large B-cell lymphoma. *Haematologica*. 2010;95(4):597-603.
161. Staudt LM. Oncogenic Activation of NF-kB. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010;2:a000109.
162. Sternberg C. Über eine eigenartige unter dem Bilde der Pseudoleukämie verlaufende Tuberculose des lymphatischen Apparates. *Ztschr Heilk*. 1898;19:21-90.
163. Sun Y, Joks M, Xu LM, et al. Diffuse large B-cell lymphoma of the breast: prognostic factors and treatment outcomes. *Onco Targets Ther*. 2016. 6;9:2069-80.
164. Surov A, Holzhausen HJ, Wienke A, et al. Primary and secondary breast lymphoma: prevalence, clinical signs and radiological features. *Br J Radiol*. 2012;85(1014):e195–205.
165. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France: IARC Press; 2008.
166. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, et al. The 2016 revision of the World Health Organization (WHO) classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 2016;127(20):2375-90.
167. Szczuraszek K, Mazur G, Jelen M, Dziegiel P, Surowiak P, Zabel M. Prognostic significance of Ki-67 antigen expression in non-Hodgkin's lymphomas. *Anticancer Res*. 2008;28:1113–8.

168. Szydłowski M, Prochorec-Sobieszek M, Szumera-Cieckiewicz A, et al. Expression of PIM kinases in Reed-Sternberg cells fosters immune privilege and tumor cell survival in Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2017;01-760702.
169. Talwalkar S, Miranda R, Valbuena J, Routbort M, Martin A, Medeiros L. Lymphomas Involving the Breast. A Study of 106 Cases Comparing Localized and Disseminated Neoplasms. *Am J Surg Pathol*. 2008;32:1299–1309.
170. Tam W, Gomez M, Chadburn A et al. Mutational analysis of PRDM1 indicates a tumor-suppressor role in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood*. 2006;107(10):4090-4100.
171. Taniguchi K, Takata K, Chuang SS, et al. Frequent MYD88 L265P and CD79B Mutations in Primary Breast Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Am J Surg Pathol*. 2016;40(3):324-334.
172. Temmim L, Baker H, Amanguno H, Madda JP, Sinowatz F. Clinicopathological features of extranodal lymphomas: Kuwait experience. *Oncology* 2004;67(5-6):382–9.
173. The International non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med*. 1993;329:987–94.
174. Thomas A, Link BK, Altekruse S, Romitti PA, Schroeder M. Primary Breast Lymphoma in the United States: 1975-2013. *J Natl Cancer Inst*. 2017;109(6).
175. Thompson PA and Prince HM. Breast implant-associated anaplastic large cell lymphoma: a systematic review of the literature and mini-meta analysis. *Curr Hematol Malig Rep*. 2013;8:196–210.
176. Tiacci E, Trifonov V, Schiavoni G, et al. BRAF mutations in hairy-cell leukemia. *N Engl J Med*. 2011;364:2305-2315.
177. Validire P, Capovilla M, Asselain B, Kirova Y, Goudefroye R, Plancher C, et al. Primary breast non-Hodgkin's lymphoma: a large single center study of initial characteristics, natural history, and prognostic factors. *Am J Hematol*. 2009;84:133–9.
178. Van de Schans SA, Steyerberg EW, Nijziel MR, Creemers GJ, Janssen-Heijnen ML and van Spronsen DJ. Validation, revision and extension of the Follicular Lymphoma International Prognostic Index (FLIPI) in a population-based setting. *Ann Oncol*. 2010;20(10):1697-702.

179. Villa D, Connors JM, Shenkier TN et al. Incidence and risk factors for central nervous system relapse in patients with diffuse large B-cell lymphoma: the impact of the addition of rituximab to CHOP chemotherapy. *Ann Oncol* 2010;21:1046–1052.
180. Vlashi E and Pajonk F. Cancer Stem Cells, Cancer Cell Plasticity and Radiation Therapy. *Semin Cancer Biol*. 2015;31:28–35.
181. von Tresckow B, Plütschow A, Fuchs M, et al. Dose-intensification in early unfavorable Hodgkin's lymphoma: final analysis of the German Hodgkin Study Group HD14 trial. *J Clin Oncol*. 2012;30(9):907. Epub 2012 Jan 23.
182. Wang JQ, Jeelall YS, Ferguson LL and Horikawa K. Toll-Like Receptors and Cancer: MYD88 Mutation and Inflammation. *Front Immunol*. 2014;5:367.
183. Wang K, Li M and Hakonarson H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res*. 2010; 38(16):e164.
184. Wang L, Wang D, Chai W, Fei X, Luo R and Li X. MRI features of breast lymphoma: preliminary experience in seven cases. *Diagn Interv Radiol*. 2015;21(6):441–7.
185. Wierenga AT, Vellenga E and Schuringa JJ. Maximal STAT5-induced proliferation and self-renewal at intermediate STAT5 activity levels. *Mol Cell Biol*. 2008;28(21):6668-80.
186. Wiseman C and Liao KT. Primary lymphoma of the breast. *Cancer*. 1972;29: 1705-12. Wilks S. Cases of enlargement of the lymphatic glands and spleen (or Hodgkin's disease) with remarks. *Guy's Hosp Rep*. 1865;11:56–67.
187. Wonw WW, Schild SE, Halyard MY and Schomberg PJ. Primary non-Hodgkin lymphoma of the breast: The Mayo Clinic Experience. *J Surg Oncol*. 2002;80(1):19-25; discussion 26.
188. Wright G, Tan B, Rosenwald A, Hurt EH, Wiestner A and Staudt LM. A gene expression-based method to diagnose clinically distinct subgroups of diffuse large B cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100(17):9991-6.
189. Yang WT, Lane D, Le-Petross H, Abruzzo L and Macapinlac H. Breast lymphoma: imaging findings of 32 tumors in 27 patients. *Radiology*. 2007;245(3):692–702.

190. Yhim HY, kang HJ, Choi YH, et al. Clinical outcomes and prognostic factors in patients with breast diffuse large B cell lymphoma; Consortium for Improving Survival of Lymphoma (CISL) study. *BMC Cancer*. 2010;10:321.
191. Yhim HY, Kim JS, Kang HJ, et al. Matched-pair analysis comparing the outcomes of primary breast and nodal diffuse large B cell lymphoma in patients treated with rituximab plus chemotherapy. *Int J Cancer*. 2012;131:235–43.
192. Yoshida S, Nakamura N, Sasaki Y et al. Primary breast diffuse large B-cell lymphoma shows a non-germinal center B-cell phenotype. *Mod Pathol*. 2004;18(3):398-405.
193. Yoshida SH, Swan S, Teuber SS and Gershwin ME. Silicone breast implants: immunotoxic and epidemiologic issues. *Life Sci*. 1995;56(16):1299-310.
194. Yu H, Kortylewski M and Pardoll D. Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol*. 2007;7:41-51.
195. Yu H, Pardoll D and Jove R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat rev Cancer*. 2009;9(11):798-809.
196. Yung L & Linch D. Hodgkin's Lymphoma. *Lancet* 2003;361:943-51.
197. Zakhary JM, Hamidian Jahromi A, Chaudhery S and Kim M. Anaplastic large cell lymphoma in the setting of textured breast implant: a call for patients and physicians education. *J La State Med Soc*. 2013;165(1):26-9.
198. Zhao S, Zhang QY, Ma WJ, et al. Analysis of 31 Cases of Primary Breast Lymphoma: The Effect of Nodal Involvement and Microvascular Density. *Clin Lymphoma, Myeloma, Leuk*. 2011;11(1):33-37.
199. Zhang J, Dominguez-Sola D, Hussein S, et al. Disruption of KMT2D perturbs germinal center B cell development and promotes lymphomagenesis. *Nature medicine* 2015; 21:1190-8.
200. Zhang J, Grubor V, Love CL, et al. Genetic heterogeneity of diffuse large B-cell lymphoma. *PNSAS* 2013; 110(4):1398-1403.
201. Zhang N, Cao C, Zhu Y, et al. Primary breast diffuse large B-cell lymphoma in the era of rituximab. *Onco Targets Ther*. 2016;9:6093-6097.

202. Zhu N; Ramírez LM, Lee RL, Magnuson NS, Bishop GA and Gold MR. CD40 signaling in B cells regulates the expression of the Pim-1 kinase via the NF- κ B pathway. *J Immunol.* 2001;168(2):744–754.
203. Ziepert M, Hasenclever D, Kuhnt E, et al. Standard International Prognostic Index remains a valid predictor of outcome for patients with aggressive CD20+ B-cell lymphoma in the rituximab era. *J Clin Oncol* 2010;28(14):2373-80.
204. Zucca E, Betoni F, Roggero E, et al. Molecular analysis of the progression from *Helicobacter pylori*-associated chronic gastritis to mucosa-associated lymphoid-tissue lymphoma of the stomach. *N Engl J Med.* 1998;338(12):804.
205. Zucca E, Roggero E, Bertoni F, Cavalli F. Primary extranodal non-Hodgkin's lymphomas. Part 1: Gastrointestinal, cutaneous and genitourinary lymphomas. *Ann Oncol.* 1997;8(8):727–37.
206. Zucca E, Roggero E, Bertoni F, Conconi A, Cavalli F. Primary extranodal non-Hodgkin's lymphomas. Part 2: Head and neck, central nervous system and other less common sites. *Ann Oncol.* 1999;10(9):1023–33.

ANEXO I: CUADERNO DE RECOGIDA DE DATOS INICIALES



Data Dictionary Codebook		
Linfoma primario de mama GOTEL		
1	NHC	Text (number)
2	Fecha de nacimiento	Text (date_dmy)
3	Edad	Text (number)
4	Sexo	Dropdown H – Hombre M – Mujer
5	Hospital	Hospital Virgen de la Arrixaca Hospital Insular de Gran Canaria Hospital Dr Negrin de Gran Canaria Hospital General de Elche Hospital Puerta de Hierro Instituto Valenciano de Oncología Hospital La Fe Complejo Hospitalario de Pontevedra Hospital Serranía de Ronda Hospital San Joan de Reus Instituto Oncológico de Kutxa Hospital Virgen de la Salud de Toledo Hospital Virgen de la Macarena Hospital Virgen de la Victoria Otro Hospital

6	Otro hospital	Text
DIAGNÓSTICO		
7	Fecha de diagnóstico	Text (date_dmy)
8	Histología	Linfoma anaplásico CD30+ LDCGB Linfoma B de la zona marginal Linfoma folicular Linfoma linfoblástico Linfoma de Hodgkin Linfoma tipo MALT Linfoma T anaplásico Linfoma B de célula pequeña Otra histología
9	Otra histología	Text
10	Localización	Derecha Izquierda Bilateral
11	Afectación ganglionar	Si No Desconocido
12	Estadio	I _E II _E
13	Síntomas B	Si No Desconocido
14	Índice pronóstico	IPI/FLIPI 0 IPI/FLIPI 1 IPI/FLIPI 2 IPI/FLIPI 3 IPI/FLIPI 4
15	Datos IP	Afectación ganglionar

		Estadio Edad LDH Hemoglobina
TRATAMIENTO		
16	Tratamiento	Cirugía Quimioterapia Radioterapia Otro tratamiento
17	Otro tratamiento	Text
18	Fecha de cirugía	Text (date_dmy)
19	Tipo de cirugía	Mastectomía Turmorectomía Recambio de prótesis Otra cirugía
20	Otra cirugía	Text
21	Esquema quimioterapia	CHOP CVP M-BACOD R-COMP R-CVP R-CHP RITUXIMAB R-VMP Otro
22	Otro esquema	Text
23	Número de ciclos	Text
24	Respuesta al tratamiento	Completa Estable Parcial Progresión

		Desconocido
RECAÍDA		
25	Recaída	Si No Desconocido
26	Fecha de recaída	Text (date_dmy)
27	Tratamiento recaída	Cirugía Quimioterapia Radioterapia Otro tratamiento
28	Otro tratamiento recaída	Text
29	Fecha cirugía recaída	Text (date_dmy)
30	Tipo cirugía recaída	Mastectomía Turmorectomía Recambio de prótesis Otra cirugía
31	Otra cirugía	Text
32	Esquema QT recaída	CHOP CVP M-BACOD R-COMP R-CVP R-CHP RITUXIMAB R-VMP Otro
33	Otro esquema QT recaída	Text
34	Número de ciclos	Text
35	Respuesta recaída	Completa Estable Parcial

		Progresión Desconocido
SUPERVIVENCIA		
36	Situación actual	Vivo sin enfermedad Vivo con enfermedad Fallecido
37	Causa de fallecimiento	Por linfoma Otra causa
38	Fecha de muerte	Text (date_dmy)
39	Fecha última revisión	Text (date_dmy)
40	Observaciones	Text

ANEXO II: APROBACIÓN DE CEIC DE HUPHM



Hospital Universitario
Puerta de Hierro Majadahonda



**D^a. CRISTINA AVENDAÑO SOLÁ, PRESIDENTA DEL COMITÉ ETICO DE
INVESTIGACIÓN CON MEDICAMENTOS DEL HOSPITAL
UNIVERSITARIO PUERTA DE HIERRO MAJADAHONDA DE MADRID**

CERTIFICA

Que dicho Comité ha evaluado el proyecto de investigación titulado:

**“ANÁLISIS DE LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y MOLECULARES DEL
LINFOMA PRIMARIO DE LA MAMA, ESTUDIO ESPAÑOL MULTICÉNTRICO”.**

a solicitud del Dr. Fernando Fabio Franco Pérez del Servicio de Oncología
Médica del Hospital Universitario Puerta de Hierro, considerando que su
planteamiento global es aceptable desde el punto de vista metodológico y ético.
Acta nº 09.16.

En Majadahonda, a 23 de mayo de 2016



Fdo.: Dra. Avendaño Solá
Presidenta del CEIm

ZONA NOROESTE
C/ Joaquín Rodrigo, 2
28222 Majadahonda / Madrid



ANEXO III: CONSENTIMIENTO INFORMADO

Información al Paciente para su Participación en el proyecto con estudio genético:

“Estudio clínico y de los mecanismos moleculares implicados en el desarrollo del linfoma folicular transformado”

Nos dirigimos a usted para informarle de un proyecto de investigación en el que se le invita a participar. El presente documento tiene la finalidad de que reciba la información necesaria para que decida si desea participar o no. Para ello, le solicitamos que lo lea con detenimiento, que se tome el tiempo necesario e incluso que lo consulte con las personas que desee.

Su participación es voluntaria, y debe saber que si interviene en el estudio podrá revocar su consentimiento en cualquier momento y sin tener que dar explicaciones.

Una vez que haya leído esta hoja informativa el investigador aclarará todas las dudas que puedan surgir.

Objetivo del proyecto

Mediante este proyecto nos proponemos conocer el número de casos de linfoma folicular que sufren transformación en linfomas más agresivos.

El Linfoma Folicular (LF) constituye cerca del 20 % de los linfomas diagnosticados en la población occidental. Un acontecimiento fundamental en el transcurso de la enfermedad es su transformación a linfomas más agresivos. La incidencia de transformación es muy variable según los diferentes estudios, de un 15 hasta un 60 %. Actualmente no contamos con datos clínicos, patológicos, ni moleculares en el momento del diagnóstico que nos permitan identificar a los pacientes que en un futuro padecerán dicha transformación. Por esto, nuestro objetivo es conocer la incidencia real del LF transformado en nuestro entorno identificando las alteraciones moleculares subyacentes que permitan establecer nuevos criterios pronósticos, clínicos y terapéuticos.

La realización de pruebas y test en muestras de tejidos de pacientes que han sufrido esta transformación a linfomas más agresivos y su integración con los datos clínicos, ayudarán a comprender la biología de los LF y, principalmente a la identificar los pacientes con riesgo de transformación permitiendo mejores abordajes terapéuticos.

Para ello se procederá a tomarle una muestra de mucosa bucal, mediante enjuague bucal; o se pedirá su permiso para usar tejido sobrante de las biopsias que se le hayan realizado previamente durante su diagnóstico. A continuación se realizará un estudio genético de estos tejidos, y se estudiarán los resultados junto con los datos clínicos asociados a los mismos.

¿Qué es un estudio genético?

Es un procedimiento de laboratorio destinado a detectar cambios genéticos. En el estudio que se realizará durante el presente proyecto de investigación incluirá la detección de posibles mutaciones (presencia, ausencia o variantes de uno o varios segmentos de su material genético). Se prevé que su duración se prolongue durante tres años.

Por tanto, con su consentimiento accede a la donación de muestras de tejido que permita a los investigadores estudiar posibles avances en el conocimiento del linfoma, tanto en su aparición, evolución como posibles tratamientos.

La donación de tejido/ sangre y sus datos asociados es totalmente voluntaria, por lo que si Ud. da el consentimiento para su uso, en cualquier momento posterior puede revocarlo. En caso de producirse esta revocación, ello no supondrá ningún cambio en la relación que usted mantuviera con su médico ni perjuicio alguno en su diagnóstico /tratamiento y/o seguimiento de sus enfermedades. Producida la revocación, su muestra dejará de formar parte de la investigación aunque los datos obtenidos hasta ese momento sí formarán parte de la misma.

Finalidad y descripción del proceso

Este documento tiene como objeto, conforme regula la Ley 14/2007, de 13 de diciembre, de Investigación Biomédica, solicitar su autorización escrita para la participación en un proyecto de investigación con título “Estudio clínico y de los

mecanismos moleculares implicados en el desarrollo del linfoma folicular transformado”.

El proyecto será desarrollado en 44 hospitales de la red nacional pertenecientes al grupo GOTEL (Grupo Oncológico para el Tratamiento y Estudio de los Linfomas). El equipo investigador está formado por Oncólogos Médicos, siendo sus coordinadores el Dr. Provencio Pulla y la Dra. Margarita Sánchez-Beato Gómez pertenecientes al HU. Puerta de Hierro-Majadahonda (HUPHM). A nivel local en su centro hospitalario el médico responsable será el Dr. /Dra.....

Carácter altruista de la donación

La donación tiene por disposición legal carácter altruista, por lo que usted no obtendrá ni ahora ni en el futuro ningún beneficio económico por la misma. No está previsto compensarle por los productos que pudieran ser desarrollados a partir de esta investigación. Por lo tanto, usted renuncia a cualquier beneficio económico que pudiera corresponderle en el futuro y que sea renunciabile.

Sin embargo, el estudio pudiera tener un beneficio para su persona o sus familiares y, en todo caso, los conocimientos obtenidos gracias a los estudios llevados a cabo a partir de su muestra y de muchas otras pueden aumentar el conocimiento médico y ayudar así a otras personas.

Asimismo, y para poder completar el presente proyecto de investigación, cabe la posibilidad de que sea necesario requerir nuevamente su consentimiento para realizarle una nueva extracción de tejido o sangre así como contactar nuevamente con usted para solicitarle nueva información adicional a la ya facilitada.

Protección de datos y confidencialidad

Los datos personales que se recojan sobre Usted, incluidos aquellos que se soliciten adicionalmente al hospital conforme a la necesidad de la investigación que nos ocupa y siempre bajo su autorización, serán confidenciales y procesados de acuerdo con la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal y la legislación sanitaria y relativa a la investigación biomédica vigente, tratándose los mismos únicamente de acuerdo con los objetivos descritos en el presente proyecto de investigación. Asimismo, se informa que los resultados obtenidos con las muestras, pueden ser publicados en revistas científicas, sin embargo, serán datos totales y

expresados de modo que nunca será revelada su identidad o datos que le identifiquen o puedan llegar a identificarle.

En el momento que usted consienta el uso de muestra para los fines de investigación aplicada descritos, dicha muestra será sometida a un proceso de disociación. Es decir, sólo será identificada por un número y/o un código y se mantendrá confidencial el fichero que relaciona dicho código con sus datos personales. Dado que se trata de un estudio cuyo resultado podría en un futuro tener interés para el paciente y/o de sus familiares, los investigadores principales mantendrán el acceso a sus datos personales, pero únicamente ellos, a través de un fichero confidencial.

Información sobre resultados del estudio

Los datos que se obtengan de los análisis de la muestra serán archivados, y formarán parte del estudio / proyecto de investigación, manteniéndose durante el desarrollo del mismo. Siempre podrá solicitarnos los resultados generales del Proyecto en el que Ud. participa.

Los métodos utilizados en este proyecto son parte de una investigación biomédica y son diferentes a los realizados en la práctica clínica habitual, por lo que puede no tener valor clínico para Ud. No obstante, le corresponde a Ud. decidir si quiere recibir o no dicha información, tanto en relación con su persona como con su familia. En el caso de que Ud. haya optado por no recibir dicha información y, según criterio del médico responsable, sea necesaria para evitar un grave perjuicio para su salud o la de sus familiares biológicos, se informará a un familiar próximo o a un representante, previa consulta del comité de ética asistencial. En todo caso, la comunicación se limitará exclusivamente a los datos necesarios para estas finalidades.

Si desea más Información sobre este estudio o sobre esta investigación, puede contactar con los Investigadores principales, Dr. Mariano Provencio Pulla o Dra. Margarita Sánchez-Beato Gómez, en el siguiente nº de teléfono: 911916095.

En su hospital, el investigador encargado de suministrarle la información que precisase será

Dr/Dra..... el

Yo

(nombre).....

....., con fecha de

nacimiento....., AUTORIZO libre y voluntariamente a

que una muestra del tejido del tumor obtenida durante el diagnóstico al que se me ha sometido y una muestra de tejido no tumoral proveniente de un enjuague bucal o excedente de una biopsia previamente realizada, sean utilizadas para análisis genético, así como los datos clínicos relevantes sobre la enfermedad, su pronóstico o sensibilidad a los tratamientos.

Fecha:

Firma del paciente

DONACIÓN DE MUESTRAS EXCEDENTE AL BIOBANCO DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO PUERTA DE HIERRO-MAJADAHONDA (HUPH-M)

El Biobanco HUPH-M es un departamento donde se conservan muestras biológicas (tejidos, ADN y otros derivados) con las adecuadas garantías de seguridad y confidencialidad, con el fin de utilizarlas en la investigación de las enfermedades y contribuir a la obtención de conocimientos para mejorar el tratamiento de los pacientes. El Biobanco HUPH-M cuenta con los medios necesarios para el procesamiento y la conservación de muestras biológicas

Conforme recoge la Ley 14/2007 de Investigación Biomédica, de 3 de Julio de 2007, (LIB) y el Real Decreto (RD) 1716/2011 por el que se regula el funcionamiento de los Biobancos, se solicita su autorización escrita para la donación gratuita y el almacenamiento en el Biobanco HUPH-M, del sobrante/excedente de su/s muestra/s biológica/s así como los datos asociados a la misma, con el fin de utilizar dicho sobrante en investigación biomédica.

El Biobanco HUPH-M asegurará una adecuada conservación de las muestras biológicas y sus datos asociados. Su muestra será almacenada por un tiempo indefinido, durante el cual estará disponible para la realización de diferentes proyectos de investigación del propio centro o de otros centros que lo soliciten. Asimismo, la muestra podrá ser cedida a terceros asegurándose la confidencialidad de su información personal.

Su colaboración en esta donación es completamente voluntaria y altruista. Su participación tampoco supondrá ningún riesgo o molestia adicional ya que no se realizará ninguna prueba o intervención distinta de aquella en la que se obtiene la muestra, de tal manera que únicamente va a autorizar la investigación con muestras sobrantes. En cualquier caso usted podrá revocar en cualquier momento su consentimiento solicitando la destrucción o anonimización de las muestras (destrucción del código que vincula la muestra con su identidad).

En el caso de que de las futuras investigaciones que se lleven a cabo se desprendiesen datos que pudieran ser tanto clínica como genéticamente relevantes para su salud o la de su familia, usted debe decidir si quiere recibir o no dicha información.

Nombre y apellidos.....

DNI.....

Edad.....

Persona del Centro que informa.....

Autorizo al Hospital Universitario Puerta de Hierro-Madahonda a que el material biológico sobrante de las pruebas que se han realizado o se me vayan a realizar como parte del actual proceso asistencias sea incorporado en el Biobanco HUPH-M.

AUTORIZACIÓN DE INFORMACIÓN

- Autorizo a que el excedente de muestra utilizado para el diagnóstico y la información clínica asociada se utilice para investigación en los términos anteriormente recogidos SI NO

- Autorizo que se me comunique la información importante para mi persona o la de mis familiares derivada de la investigación

Teléfono o mail de contacto..... SI NO

- Autorizo a ser contactado en el caso que se necesite más información para cualquier proyecto en el que se utilicen mis muestras

Teléfono o mail de contacto..... SI NO

- Autorizo a anonimizar y no destruir mi muestra en caso de revocación del presente consentimiento SI NO

FIRMA

En....., a.....de.....de 20.....

ANEXO IV: COMUNICACIONES A CONGRESOS

Poster number: 3202.

Category: Haematological malignancies

18th ECCO – 40th ESMO European Cancer Congress. Vienna, Austria - Sep 2015.

CLINICAL CHARACTERISTICS OF PRIMARY BREAST LYMPHOMA.

F. Franco¹, J. Lavernia², M. Provencio¹, M. Chilet Lloris², D. Perez-Callejo¹, B. Cantos¹.
HOSPITAL UNIVERSITARIO PUERTA DE HIERRO MAJADAHONDA, SPAIN¹.
INSTITUTO VALENCIANO DE ONCOLOGÍA, SPAIN².

INTRODUCTION AND OBJECTIVES

Primary lymphoma of the breast is a rare entity that represents 0.4% of breast neoplasms, 0.4-0.7% of all non-Hodgkin lymphomas (NHL) and 2% of extranodal NHL. In other series diffuse large B cell lymphoma (DLBCL) is the most common type, followed by Follicular Lymphoma, among others.

Our work aims to describe the clinicopathological aspects of a series of patients with primary lymphoma of the breast and its clinical course according to treatment in two hospitals in Spain.

MATERIALS AND METHODS

We analyzed the clinical data of a series of 16 patients with primary lymphoma of the breast, treated at two hospitals in Spain and evaluated variables like age, Ann Arbor stage, lymph node involvement, IPI (International Prognostic Index), treatment and survival.

RESULTS:

The study includes 16 women with a mean age of 69 years (29 to 86 years). The right breast was affected in 56.9% of patients, histological types corresponded to DLBCL in 75%, marginal zone B lymphoma in 12.5% and MALT and small cell B lymphoma in 6.25% each.

Lymph node involvement was found in 43.75%. According to stage, 68.75% were in IE and 18.75% and 12.5% in IIE and IVE, respectively. Two patients (12.5%) had B symptoms, IPI was 0 in 25%, 1 in 50% and 12.5% for IPI 2 and each. Of the 16 patients, 3 underwent surgery without a previous histological diagnosis; 15 (93.75%) had been treated with chemotherapy and rituximab, R-CHOP (73.3%) and R-CVP (26.6%); 35% (total) subsequently received radiotherapy, complete response was achieved in 97.5%. Median follow-up was 48.5 months (range 11.2 - 86.7 months) and the probability of survival at 3 years was 85% (95% CI 65-100).

CONCLUSIONS:

Primary lymphoma of the breast is rare. Its management should be based on chemo-immunotherapy with rituximab given the high response rate achieved with this treatment which is confirmed in our series with a high probability of survival at 3 years.



Dear Mr. Franco Pérez,

Thank you for attending the **18th ECCO - 40th ESMO European Cancer Congress** in Vienna (Austria) from 25 to 29 September 2015, and presenting the abstract, selected for **Poster**, listed below.

"Clinical characteristics of primary breast lymphoma", was presented in the **Poster Session** on **"Haematological Malignancies"** on **26 September 2015**.

Yours sincerely,

Professor Peter Naredi
Scientific Co-Chair

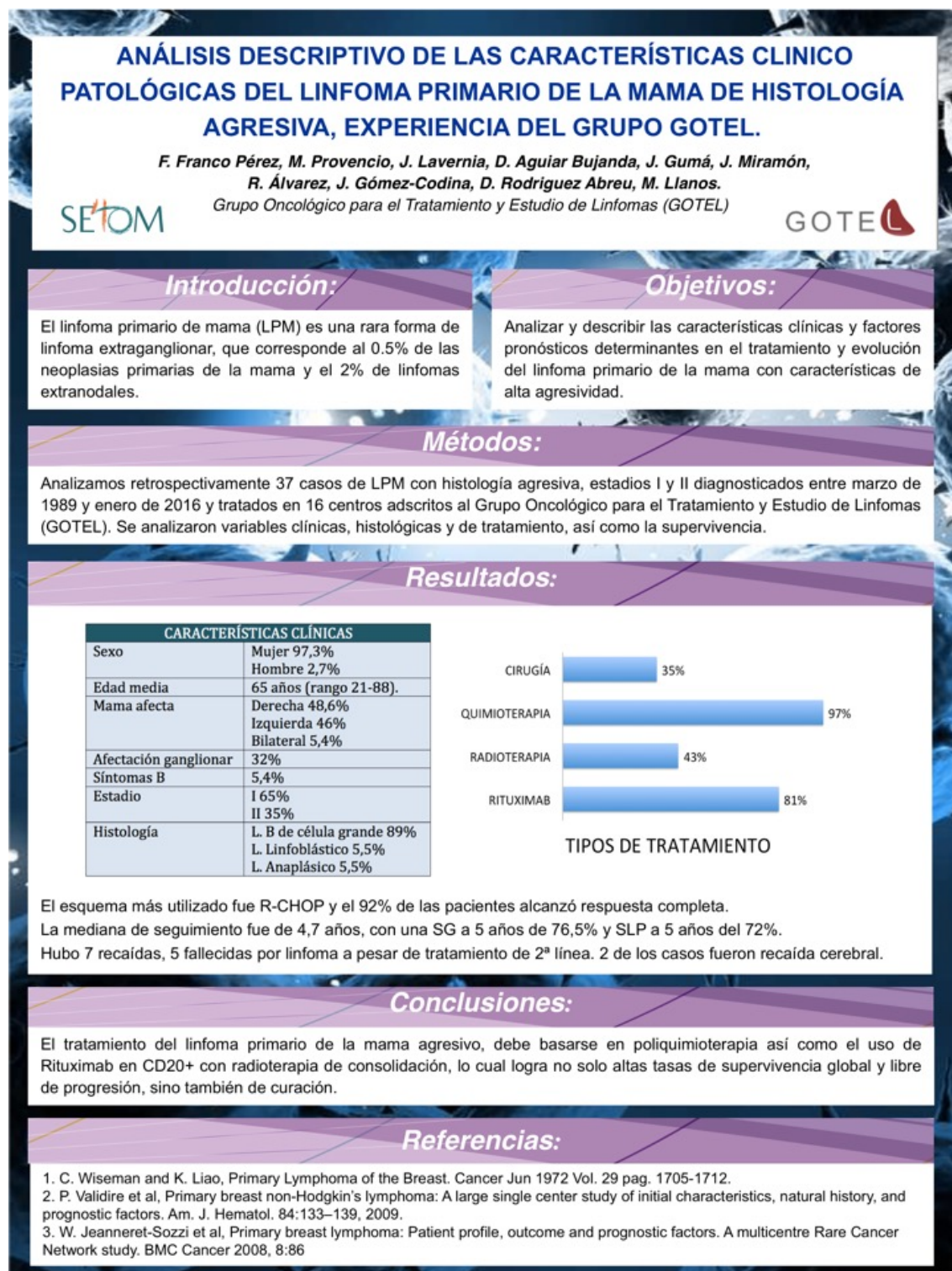
Professor Elisabeth de Vries
Scientific Co-Chair

sent on: 27 July 2017

Poster number: P. EXP-33 (Poster expuesto – destacado).

Category: Haematological malignancies

Congreso nacional SEOM 2016. Madrid, España - Oct 2016.





La Secretaría Técnica del **congreso de la Sociedad Española de Oncología Médica, SEOM2016**, que se celebró los días 26, 27 y 28 de Octubre de 2016 en Madrid, CERTIFICA que:

Fernando Franco Pérez, Mariano Provencio Pulla, Javier Lavernia Giner, David Aguiar Bujanda, Josep Gumá Padro, José Miramón López, Ruth Álvarez, José Gómez Codina, Delvys Rodriguez Abreu, Marta Llanos

han presentado la comunicación titulada

ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LAS CARACTERÍSTICAS CLINICO PATOLÓGICAS DEL LINFOMA PRIMARIO DE LA MAMA (LPM) DE HISTOLOGÍA AGRESIVA, EXPERIENCIA GRUPO ONCOLÓGICO PARA EL TRATAMIENTO Y ESTUDIO DE LINFOMAS (GOTEL).

seleccionada como comunicación **Póster Expuesto**
con el número **PEXP33**

Para que conste a los efectos oportunos, emitimos el presente certificado en Madrid, 28 de Octubre de 2016.

Sin otro particular, reciba un cordial saludo,

D. César A. Rodríguez Sánchez

Secretario General de la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM)

Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM)
Velázquez, 7 - 3ª
28001 Madrid

Poster number: P. 218 (Poster digital).

Category: Haematological malignancies

Congreso nacional SEOM 2016. Madrid, España - Oct 2016.



POSTER DIGITAL LINFOMAS

P 218

Linfomas primarios de mama indolentes (lpmi). Revisión de la casuística del grupo oncológico para el tratamiento y estudio de los linfomas (GOTEL).

Javier Lavernia – I.V.O., Valencia. **Fabio Franco** – H.U. Puerta de Hierro, Majadahonda. **David Aguilar Bujanda** – H.U. Dr. Negrín, Gran Canaria. **Josep Gumà** – H.U. Sant Joan, Reus. **Ruth Álvarez** – Virgen de la Salud, Toledo. **Francisco García-Arroyo** – Complejo hospitalario, Pontevedra. **Miguel Marín** – Virgen Arrixaca, Murcia. **Delvys Rodríguez-Abreu** – H.U. Insular, Gran Canaria. **Esteban Nogales** – Virgen Macarena, Sevilla. **Mariano Provencio** – H.U. Puerta de Hierro, Majadahonda

Introducción y Objetivos: El linfoma primario de mama (LPM) representa una forma infrecuente de presentación de los linfomas y menos del 30% de los LPM corresponden a linfomas de bajo grado (formas indolentes). Nuestro objetivo es revisar las características clínicas e histológicas de esta forma rara de linfomas en una localización excepcional y los tratamientos efectuados.

Material y Métodos: Revisamos los datos referentes a 14 LPMi, facilitados por 8 servicios de OM pertenecientes a GOTEL, que han sido diagnosticados en un periodo de 102 meses (8.5 años). Excluimos del análisis los estadios III-IV, siguiendo los criterios de Wiseman y Liao.

Resultados: Analizamos 14 mujeres diagnosticadas de LPMi con una edad media de 61.6 años (rango 32-84), 7 localizados en mama dcha, 5 en mama izda y 2 bilaterales. Histológicamente, 6 fueron Linfomas zona marginal (LZM), 4 foliculares (LF), 2 MALT y 2 L célula pequeña. 7 casos fueron estadios I y el mismo número de estadios II. Síntomas B en 0/14. Quirúrgicamente, sólo se efectuaron tumorectomías diagnósticas en 4 casos. Recibieron RT 5 mujeres, en 2 casos asociadas a rituximab-QT (R-QT), rituximab en monoterapia en 2 casos y R-QT exclusiva en 4 casos. 13 pacientes alcanzaron la RC y 1 EE. Presentaron recaída 4 casos: 2 MALT, 1 LF y 1 LZM. Con un seguimiento medio de 46 meses, viven el 100% de las pacientes, 12 de ellas libres de enfermedad.

Conclusión: Los LPMi son excepcionalmente raros, lo que justifica la falta de un criterio uniforme en su manejo. La combinación de R-QT y RT consigue excelentes resultados con elevados porcentajes de curación.

P 219

Mitoxantrona, etopósido y prednisona (MVP) y rituximab, mitoxantrona, etopósido y prednisona (R-MVP) en el tratamiento de pacientes ancianos con diagnóstico

de síndrome linfoproliferativo. Serie retrospectiva de 33 pacientes tratados en nuestro centro desde el 2005 hasta la fecha actual. Datos de eficacia y toxicidad.

Dilara Akhoundova Sanoyan, Corina Escóin Pérez, Carmen Salvador Coloma, Oscar Mauricio Niño Gómez, Edwin Navarro Galvis, Marcos Melián Sosa, Juan Antonio Méndez García, María Eugenia Medina Ortiz, Alba Torres Martínez, José Gómez Codina – Hospital Universitario y Politécnico La Fe

Introducción y Objetivos: El tratamiento de los síndromes linfoproliferativos (SL) en pacientes (pts) ancianos se encuentra limitado con frecuencia por su estado funcional y comorbilidad, no siendo subsidiarios en muchas ocasiones de recibir poliquimioterapia estándar.

Material y Métodos: Revisión de 33 pts diagnosticados de SL y tratados con MVP (mitoxantrona 10 mg/m² intravenosa (iv), etopósido 100 mg/m² iv y metilprednisolona 80mg iv el día 1, etopósido 200 mg/m² y prednisona 25 mg/m² orales días 2-3, cada 21 días) o R-MVP (con rituximab 375 mg/m² iv el día 1) desde 2005 hasta 2015 en nuestro centro.

Resultados: Edad media al tratamiento fue de 76.8 años (rango [r]: 57.1-86.7). PS fue 1 en 10 pts (30.3%), 2 en 10 (30.3%) y 3 en 13 (39.4%). 14 pts tratados en primera línea (42.4%), 13 en segunda (39.39%) y resto en tercera o posteriores. Histología principal fue linfoma difuso de células grandes B (LDCGB) en 25 pts (75.8%). Otras fueron folicular (2), T anaplásico ALK negativo (2), linfocítico (2), Hodgkin (1) y MALT (1). Los estadios Ann Arbor fueron: IV en 24 pts (72.7%), III en 5 (15.15%). Número medio de ciclos fue 3.7 (r: 1-9). La toxicidad hematológica grado (G) 3-4: anemia en 16 (48.5%), neutropenia en 19 (57.6%), trombopenia en 14 (42.4%). 13 pts (39.4%) presentaron fiebre neutropénica (FN). Factores estimulantes de colonias granulocíticas se emplearon en 22 (66.7%), con FN entre estos en 31.8%. Para los 20 pts con PS <3 toxicidad G3-4 fue menor: anemia en 6 (30%), neutropenia en 10 (50%), trombopenia en 5 (25%) y FN en 7 (35%). Tasa de respuestas fue 36.4%, 9 respuestas completas (RC; 27.3%) y 3 parciales (RP; 9.1%). En los 13 pts con PS 3 fue 15.4% (1 RC y 1 RP). Mediana de duración de respuesta en 14 pts evaluables con control de enfermedad fue 20.4 meses (r: 3.15-49.09). Interrupción del tratamiento fue por toxicidad en 13 (39.4%), progresión de enfermedad (PE) en 10 (30.3%), respuesta en 8 (24.2%) y enfermedad estable (EE) en 2 (6.1%); en los pts con PS3 por toxicidad (53.8%) y PE (38.5%). 5 pts continúan libres de enfermedad (15.2%) con mediana de seguimiento de 47.7 ms (r: 24.6-110.6).

Conclusión: [R]MVP puede ser una opción a considerar en el tratamiento de SL en pts ancianos con PS=<2.



La Secretaría Técnica del **congreso de la Sociedad Española de Oncología Médica, SEOM2016**, que se celebró los días 26, 27 y 28 de Octubre de 2016 en Madrid, CERTIFICA que:

Javier Lavernia, Fernando Fabio Franco, David Aguiar Bujanda, Josep Gumá, Ruth Álvarez, Francisco García-Arroyo, Miguel Marín, Delvys Rodríguez-Abreu, Esteban Nogales, Mariano Provencio

han presentado la comunicación titulada

LINFOMAS PRIMARIOS DE MAMA INDOLENTES (LPMi). REVISIÓN DE LA CASUÍSTICA DEL GRUPO ONCOLÓGICO PARA EL TRATAMIENTO Y ESTUDIO DE LOS LINFOMAS (GOTEL)

seleccionada como comunicación **Póster Digital**
con el número **PDIG218**

Para que conste a los efectos oportunos, emitimos el presente certificado en Madrid, 28 de Octubre de 2016.

Sin otro particular, reciba un cordial saludo,

D. César A. Rodríguez Sánchez

Secretario General de la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM)

Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM)
Velázquez, 7 - 3ª
28001 Madrid

Comunicación oral: 0-43.

Categoría: Neoplasias hematológicas

Congreso nacional SEOM 2017. Madrid, España - Oct 2017.



La Secretaría Técnica del **congreso de la Sociedad Española de Oncología Médica, SEOM2017**, que se celebró los días 24, 25, 26 y 27 de Octubre de 2017 en Madrid, CERTIFICA que:

Fernando Franco Pérez, Julia González-Rincón, Javier Lavernia Ginés, Juan Fernando García, José Miramón, José Gómez-Codina, Delvys Rodríguez-Abreu, Jesús Alfaro, Mariano Provencio Pulla, Margarita Sánchez-Beato

han presentado la comunicación titulada

ANÁLISIS MUTACIONAL DEL LINFOMA B DIFUSO DE CÉLULA GRANDE PRIMARIO DE MAMA, UN ESTUDIO DEL GRUPO ONCOLÓGICO PARA EL TRATAMIENTO Y ESTUDIO DE LINFOMAS (GOTEL).

seleccionada como comunicación Oral
con el número O-43.

Para que conste a los efectos oportunos, emitimos el presente certificado en Madrid, 27 de Octubre de 2017

Sin otro particular, reciba un cordial saludo

D. César A. Rodríguez Sánchez
Secretario General de la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM)

ANEXO V: PUBLICACIONES

Primary Breast Lymphoma: Analysis of 55 Cases of the Spanish Lymphoma Oncology Group

Fernando Franco Pérez,¹ Javier Lavernia,² David Aguiar-Bujanda,³ José Miramón,⁴ Josep Gumá,⁵ Rut Álvarez,⁶ José Gómez-Codina,⁷ Francisco García Arroyo,⁸ Marta Llanos,⁹ Miguel Marin,¹⁰ Jesus Alfaro,¹¹ Cristina Quero,¹² Mayte Delgado,¹³ Esteban Nogales,¹⁴ Francisco Menarguez,¹⁵ Natividad Martinez,¹⁵ Maria Torrente,¹ Ana Royuela,¹⁶ Delvys Abreu,¹⁷ Mariano Provencio¹

Abstract

We reviewed 55 patients diagnosed with primary breast lymphoma, stages IE and IIE, in 16 Spanish institutions. Of the 55 cases, 96.4% corresponded to non-Hodgkin lymphoma. Results of 5-year progression-free and overall survival were 73% and 76%, respectively. Current treatments achieve good control of the disease, with an overall survival of 5 years in 80% of the patients.

Introduction: Primary breast lymphoma is a rare form of localized extranodal lymphoma, which affects the mammary glands unilaterally or bilaterally, and can also affect the regional lymph nodes. **Materials and Methods:** We reviewed 55 patients, with disease stages IE and IIE, diagnosed in 16 Spanish institutions between 1989 and 2016. A series of clinical variables and treatment were collected, and overall survival (OS) and progression-free survival (PFS) were calculated. **Results:** Of the 55 patients, 96.4% were women with an average age of 69 years. A total of 53 patients corresponded to non-Hodgkin lymphoma (NHL), of whom 36.3% had lymph node involvement upon diagnosis. Of the patients, 58.2% were stage IE, and 41.8% were stage IIE. Treatments received included radiotherapy (36.3%), chemotherapy (85.5%), and rituximab (in 38 of the 45 patients with NHL treated with chemotherapy). In all, 82.2% of complete responses were achieved. OS and progression-free survival at 5 years in NHL patients was 76% and 73%, respectively. **Conclusion:** Current treatments (chemotherapy, immunotherapy, and radiotherapy) achieve good control of the disease, with an OS of 5 years in 80% of the patients, although there is no consensus in treatment, given the scarce incidence of these lymphomas.

Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia, Vol. ■, No. ■, ■-■ © 2016 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Keywords: Chemotherapy, Extranodal lymphoma, Immunotherapy, Lumpectomy, Neoplasms of the breast

¹Department of Medical Oncology, Hospital Universitario Puerta de Hierro, Majadahonda, Spain

²Department of Medical Oncology, Instituto Valenciano de Oncología, Valencia, Spain

³Department of Medical Oncology, Hospital Universitario de Gran Canaria Doctor Negrín, Las Palmas de Gran Canarias, Spain

⁴Department of Medical Oncology, Hospital Serranía de Ronda, Málaga, Spain

⁵Department of Medical Oncology, Hospital Universitari Sant Joan de Reus, Reus, Spain

⁶Department of Medical Oncology, Hospital Universitario Virgen de la Salud, Toledo, Spain

⁷Department of Medical Oncology, Hospital Universitari i Politècnic La Fe, Valencia, Spain

⁸Department of Medical Oncology, Complejo Hospitalario de Pontevedra, Pontevedra, Spain

⁹Department of Medical Oncology, Hospital Universitario de Canarias, San Cristóbal de La Laguna, Spain

¹⁰Department of Medical Oncology, Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia, Spain

¹¹Department of Medical Oncology, Instituto Oncológico de Kutxa, Donostia, Spain

¹²Department of Medical Oncology, Hospital Universitario Virgen de la Victoria, Málaga, Spain

¹³Department of Medical Oncology, Hospital Universitario San Cecilio, Granada, Spain

¹⁴Department of Medical Oncology, Hospital Universitario Virgen de la Macarena, Sevilla, Spain

¹⁵Department of Medical Oncology, Hospital General Universitario de Elche, Alicante, Spain

¹⁶Department of Biostatistics, Hospital Universitario Puerta de Hierro, Majadahonda, Spain

¹⁷Department of Medical Oncology, Hospital Universitario Insular de Gran Canaria, Las Palmas de Gran Canarias, Spain

Submitted: Jul 30, 2016; Revised: Sep 3, 2016; Accepted: Sep 8, 2016

Address for correspondence: Fernando Franco Pérez, MD, Department of Clinical Oncology, Hospital Puerta de Hierro, Calle Manuel de Falla, 1, 28222 Majadahonda, Madrid, Spain

E-mail contact: f3franc@gmail.com

Primary Breast Lymphoma in Spain

Introduction

Primary breast lymphoma (PBL) is a rare form of presentation of extranodal lymphoid neoplasm. It represents approximately 0.5% of all primary malignant neoplasms of the breast and between 1.7% and 2.2% of extranodal lymphomas.¹⁻⁵ It was first described in 1972 by Wiseman and Liao,⁶ in a group of 31 patients diagnosed between 1951 and 1970, defining it as the infiltration of breast tissue by lymphoma with or without regional lymph node in patients without a history of prior nodal or extranodal lymphoma and systemic disease at the time of diagnosis. These criteria were reviewed in 1990 by Hugh et al.⁷ More than 96% of the cases of PBL affect women, and the average age of presentation is between 60 and 70 years old, without clear clinical or demographic differences.^{1-5,8-10} Clinically, it is presented as a palpable mass, unipainful, without clear radiologic differences from carcinomas, and can be associated to ipsilateral axillary lymph nodes.^{1-5,10,11} Approximately 11% of the cases of PBL show bilateral involvement. More than 95% of the cases correspond to B-type non-Hodgkin lymphoma (NHL), of which 60% to 85% are diffuse large B-cell lymphoma. Much less common are the follicular lymphomas, mucosa-associated lymphoid tissue, or marginal zone lymphomas.¹⁻¹² Isolated cases of very aggressive lymphomas, such as Burkitt lymphoma, particularly in patients with immunosuppression treatment, have been published. Moreover, T lymphomas, which include anaplastic large cell lymphoma and Hodgkin lymphoma (HL), represent a small fraction of PBL, hardly reaching 5% and 1%, respectively.¹²⁻¹⁶ Current treatments (chemotherapy, immunotherapy, and radiotherapy) achieve good control of the disease, with an overall survival (OS) of 5 years in 80% of the patients, although there is no consensus in treatment, given the scarce incidence of these lymphomas.^{1-10,17-24}

Material and Methods

From March 1989 to January 2016, a total of 55 patients with PBL were diagnosed and treated in the Medical Oncology Department of 16 Spanish hospitals, all members of GOTEL, the Spanish Lymphoma Oncology Group. Only patients with stages IE to IIE were included, and patients with bilateral affection were considered IIE. Clinical data were analyzed according to the modified criteria of Wiseman and Liao, and the histologic classification of the World Health Organization, 2008.^{1,6,7,25}

The collected data include the age at diagnosis, the affected breast, stage, type of treatment (surgery, chemotherapy, radiotherapy, and chemo-immunotherapy), type of response, pattern of relapse, relapse, OS, and progression free survival. All analyses were performed using Stata v14.1 (StataCorp, 2015, College Station, TX). Survival analysis at 3, 5, and 10 years was calculated using the non-parametric estimator of Kaplan-Meier, and the comparisons of survival with the log-rank test. A *P*-value < .05 was considered statistically significant, and an analysis was performed in order to analyze the potential clinical impact of the age, types of treatments and analysis of control of the disease, and the PFS and OS rates.

Results

A total of 55 patients were analyzed, 53 of whom were women with an average age of 69 years (range, 29-86 years). A total of 53 patients were diagnosed with NHL, and only 2 patients with HL; one of them nodular sclerosing type and the other rich in

lymphocytes type (Table 1). Of the patients, 36.4% presented with lymph node involvement, 52.7% presented with right breast affection, and 7.27% presented with bilateral affection; 58.2% of the patients presented with stage IE and 41.8% with stage IIE. Of the whole cohort, only 2 patients presented B symptoms at diagnosis. The clinical features of patients with NHL are detailed in Table 2, of which 70% correspond to aggressive lymphomas and 30% to indolent lymphomas.

Surgery, radiation, and chemotherapy, alone or combined, have been used according to each case, and a single patient with indolent lymphoma (follicular lymphoma) remains under observation with stable disease (Table 3). A total of 21 patients (38.2%) underwent surgery, lumpectomy being the procedure most performed (60%), followed by simple mastectomy (25%), and replacement of prosthesis and/or capsulectomy in 3 cases (15%). These last 3 cases correspond to patients with a diagnosis of breast implant-associated anaplastic large cell lymphoma, of which only 1 patient received subsequent chemotherapy with a CHOP (cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, prednisolone) scheme, with subsequent relapse and death from the disease. A total of 36.4% of patients were treated with radiotherapy alone or in combination with other treatments. Specifically, only 2 patients were treated with radiotherapy alone, both with radiologic complete response and without relapse. Of the 55 patients, 85.4% were treated with chemotherapy (45 NHL and 2 HL), and of these, 19 were treated with chemotherapy alone. Of 45 patients with NHL treated with chemotherapy, 38 of them received rituximab, and the 7 remaining cases were pre-rituximab or T lymphomas. Of these 45 patients, 77.5% received anthracyclines as part of the scheme of chemotherapy. All chemotherapy schemes used are detailed in Table 4.

In terms of response to the initial treatment, 86.7% were complete responses, 5.4% were partial responses, 3.7% were disease stabilization, and 3.7% were disease progression (2 cases, 1 corresponding to a diffuse large B-cell lymphoma and 1 to breast implant-associated anaplastic large cell lymphoma), thereby demonstrating a higher rate of complete responses in patients with aggressive lymphoma compared with indolent lymphomas.

Toward the end of the study, 10 patients had relapsed and were treated with second-line treatments, reaching full response in 50% of the cases, partial response in 10% of the cases, and progression of disease in 40% of the cases. These progressions correspond to

Table 1 Histologic Type of Lymphoma (55 Patients)

Histologic Type	N	%
DLBCL	33	60
Marginal zone/MALT	8	14.5
Follicular lymphoma	3	5.45
BIA-ALCL	3	5.45
SLL	2	3.63
ALCL CD30 +	2	3.63
B-lymphoplastic lymphoma.	2	3.63
Hodgkin lymphoma	2	3.63

Abbreviations: ALCL CD30+ = anaplastic large-cell lymphoma CD30+; BIA-ALCL = breast implant-associated anaplastic large cell lymphoma; DLBCL = diffuse large B-cell lymphoma; MALT = mucosa-associated lymphoid tissue; SLL = small lymphocytic lymphoma.

Table 2 Clinical Characteristics of the Cohort of Patients With NHL

Characteristics	Total Cases N (%)	Indolent N (%)	Aggressive N (%)
Total	53 (100)	16 (30)	37 (70)
Age			
<40 years	9 (17)	2 (12.5)	7 (18.9)
40-60 years	19 (35.8)	6 (37.5)	13 (35)
>60 years	25 (47)	8 (50)	17 (45.9)
Gender			
Female	52 (98.1)	16 (100)	36 (97.2)
Male	1 (1.88)	0 (0)	1 (2.7)
Node involvement	24 (45.28)	8 (50)	16 (43.24)
Laterality of tumor			
Right	28 (52.8)	9 (56.25)	18 (48.6)
Left	21 (39.6)	5 (31.25)	17 (46)
Bilateral	4 (7.5)	2 (12.5)	2 (5.4)
Stage			
IE	33 (62.2)	8 (50)	25 (67.5)
IIIE	20 (37.7)	8 (50)	12 (32.4)
B-symptoms			
Yes	2 (3.7)	0 (0)	2 (5.4)
No	51 (96.2)	16 (100)	35 (94.6)

Abbreviation: NHL = non-Hodgkin lymphoma.

high-grade lymphomas, which were the main cause of death in all of these cases. Of note, 2 of these progressions relapsed at the central nervous system level, both with diffuse large B-cell lymphoma.

Patients with NHL had a median follow-up of 4.7 years, and 80% of them showed an OS of 3 years, 76% of 5 years, and 71% of 10 years, whereas the PFS was 78%, 73%, and 64%, respectively (Figures 1 and 2). According to the treatment received, patients with NHL treated with anthracyclines presented better OS rates than the patients who received schemes without anthracyclines (3-year OS, 81.7% vs. 61.18% and 5-year OS, 76.59% vs. 61%); no statistically significant differences were observed ($P = .23$). Similarly, PFS varied depending on whether patients received

Table 3 Type of Treatment Received

Treatment Type	Total N (%)	Indolent N (%)	Aggressive N (%)
Total	53 (100)	16 (30.18)	37 (69.8)
Observation	1 (1.8)	1 (6.25)	0 (0)
Surgery only	5 (9.43)	4 (25)	1 (2.7)
RT only	2 (3.77)	2 (12.5)	0 (0)
Chemotherapy only	17 (32)	4 (25)	13 (35.1)
Surgery/chemotherapy	9 (17)	2 (12.5)	7 (19)
Chemotherapy/RT	12 (22.6)	1 (6.25)	11 (29.7)
Surgery/chemotherapy/RT	6 (11.3)	1 (6.25)	5 (13.5)
Rituximab (NHL)	39 (73.6)	8 (50)	31 (83.8)

Abbreviations: NHL = non-Hodgkin lymphoma; RT = radiotherapy.

Table 4 Chemotherapy Regimens

Chemotherapy Regimens	N	%
R-CHOP	29	61.70
CHOP	5	10.63
R-CVP	4	8.51
CVP	2	4.25
Rituximab only	2	4.25
ABVD	2	4.25
R-COMP	1	2.12
R-MVP	1	2.12
M-BACOP	1	2.12

Abbreviations: ABVD = Doxorubicin, bleomycin, vinblastine, dacarbazine; CHOP = cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, prednisolone; COMP = cyclophosphamide, non-pegylated liposome-encapsulated doxorubicin, vincristine and prednisone; CVP = cyclophosphamide, vincristine, prednisolone; M-BACOP = mabtera, bleomycin, epidoxorubicin, cyclophosphamide, vincristine and prednisone; MVP = mitomycin, vinblastine, and cisplatin; R = rituximab.

anthracyclines or not (3-year PFS, 81.7% vs. 61.1% and 5-year PFS, 76.6% vs. 61%), reaching statistical significance ($P = .05$).

In the case of immunotherapy, no significant differences were observed in OS and PFS, as most of the patients were treated with rituximab. OS at 3 years was observed in 81.6% of the rituximab-treated patients versus 62.5% in non-rituximab-treated patients ($P = .98$), whereas the PFS at 3 years was 81.6% in rituximab-treated patients versus 62.5% in non-rituximab-treated patients; and the PFS at 5 years was 74.8% versus 62.5% ($P = .83$).

With regard to the stage of the disease, no significant differences were observed in OS and PFS, most likely owing to the small sample size as shown in Table 5.

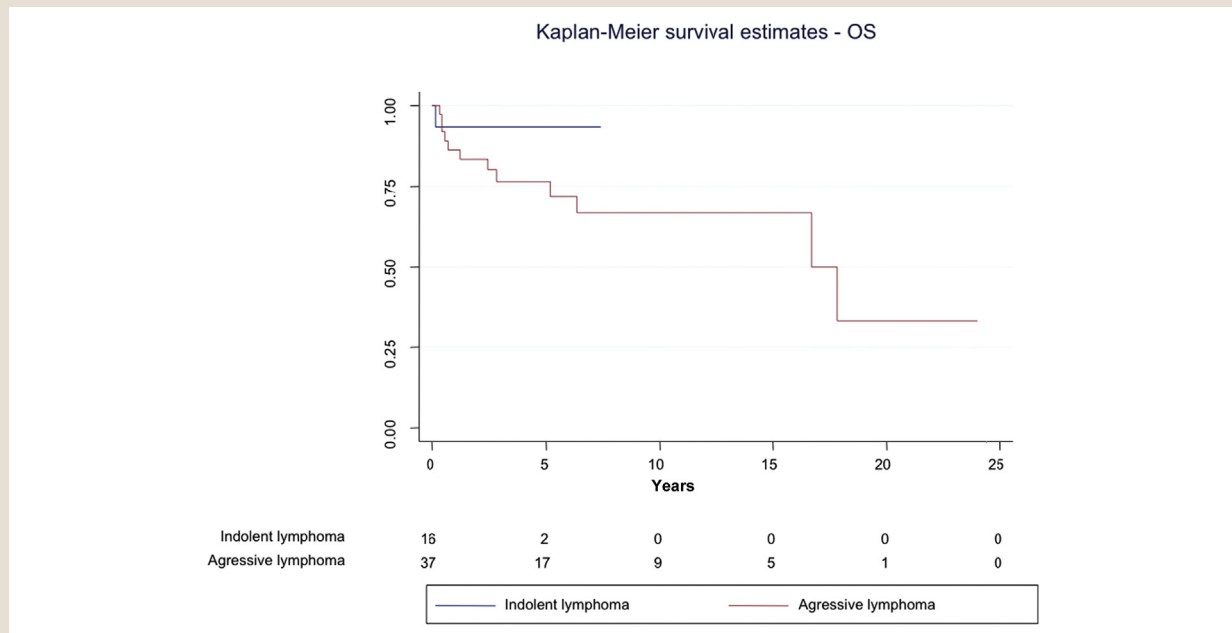
Also, no significant differences were observed in the analysis of survival according to age groups affected by the disease, with the survival at 5 years 76.5% in patients younger than 40 years old, 82.7% in patients between 40 and 60 years old, and 72.1% in patients over 60 years ($P = .81$), with a PFS of 76.5%, 82.7%, and 68.7%, respectively ($P = .54$).

The survival analysis based on the aggressiveness of the tumor shows no significant differences, with a 5-year global survival of 93% in the group of indolent lymphomas and 76.5% in the group of aggressive tumors ($P = .38$), whereas the PFS was 83.7% and 71.7%, respectively ($P = .65$).

Discussion

PBL is a rare form of extranodal lymphoma, which almost exclusively affects women.¹⁻¹⁰ Its low incidence makes recruitment difficult, and therefore, published studies are mostly retrospective and descriptive, both from a clinical and histologic point of view. Our series of patients brings together a total of 55 cases of PBL, strictly according to the definition of Wiseman and Liao from 1972 and reviewed in 1990 by Hugh et al,^{6,7} which constitute one of the few pure studies of PBL, longer than many of the publications that exist to date, which include patients with stages IIIE and IVE disease.^{1,11,15,22-24,26-28} Our results are consistent with previous publications, in which the largest number of cases correspond to large B-cell lymphoma (60%), followed by B marginal zone lymphoma (14.5%) and follicular lymphoma (5.45%),

Primary Breast Lymphoma in Spain

Figure 1 Overall Survival (OS) for Indolent and Aggressive Primary Breast Lymphoma (PBL)

with a small percentage representing rare histologies, including HL, of which 2 cases were diagnosed.¹⁻¹²

Generally, PBL is presented as a palpable mass in the breast that may or may not be accompanied by axillary lymph nodes, which makes it clinically difficult to differentiate from a breast carcinoma. Despite some studies trying to identify x ray patterns suggestive of this entity, no specific radiologic or

imaging patterns characteristic of this disease have been determined.²⁹⁻³⁴

Thick needle biopsy is the most common technique used for reaching a histologic diagnosis of PBL. However, in many cases, the tissue available for immunohistochemical study is insufficient, so there are still a significant percentage of patients who need to undergo surgery in order to ensure the definitive diagnosis.^{26,35-37}

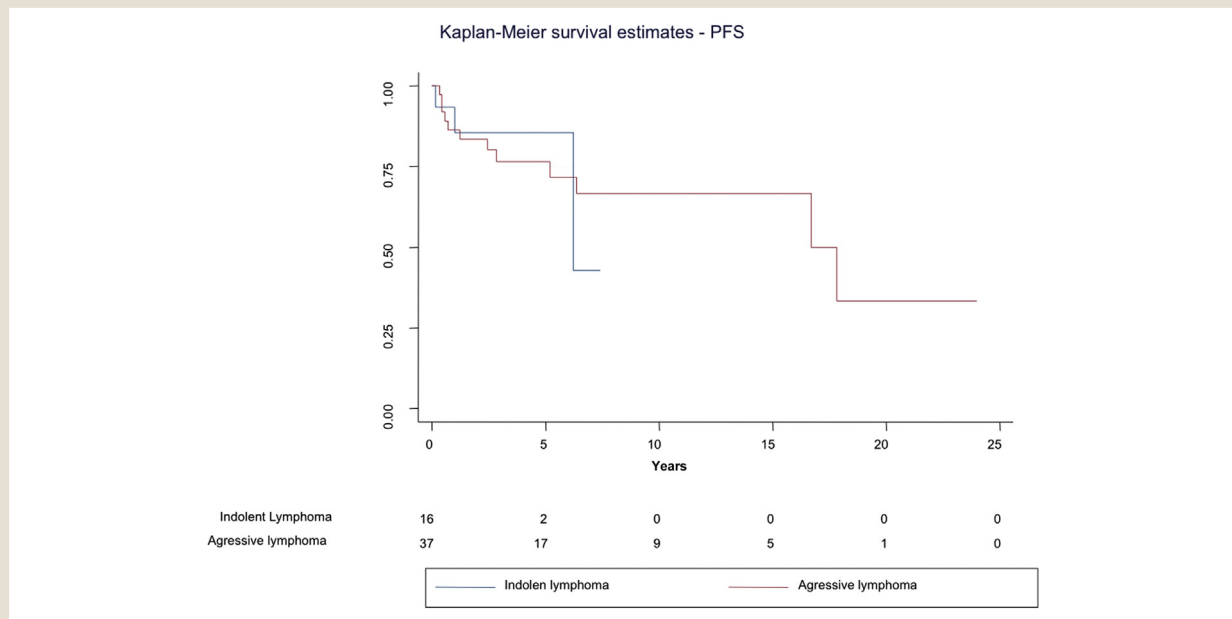
Figure 2 Progression-Free Survival (PFS) for Indolent and Aggressive Primary Breast Lymphoma (PBL)

Table 5 Survival of Different Stages

	OS (<i>P</i> = .39) %			PFS (<i>P</i> = .14) %		
	3 years	5 years	10 years	3 years	5 years	10 years
Stage IE	85	78	78	80	78	78
Stage IIE	73.5	73.5	57.2	68.5	68.5	41.6

Abbreviations: OS = overall survival; PFS = progression-free survival.

Currently, there is not a well-established recommendation for treatment, given that PBL is a rare entity, and no prospective studies have been performed. Since the beginning of the 1990s, it has been well-known that surgery does not improve survival. This was confirmed by Jennings et al in a retrospective study of 465 patients, where they evaluated the role of mastectomy in PBL.³⁸ A particular case is the anaplastic large-cell lymphoma, which is associated with breast prostheses, in which case the surgical treatment, depending on etiology of disease, is the capsulectomy, the definitive replacement, or the removal of the prosthesis as a causal agent, offering important possibilities for the control of the disease.³⁹⁻⁴¹ As a matter of fact, this was the treatment performed in 3 patients of our series with anaplastic large-cell lymphoma associated with prosthesis. Only 2 of our patients with non-aggressive lymphomas (mucosa-associated lymphoid tissue) underwent surgery and subsequently relapsed locally with a 15- and 21-month disease-free interval, respectively. Consequently, the first case was treated with surgery and the second with radiotherapy, both with complete response.

Systemic treatment with chemotherapy remains the basis of management of PBL, with the schemes generally used being R-CHOP or similar, where the use of anthracyclines and rituximab have demonstrated to have a beneficial effect on PFS and OS.^{1-5,9,10,15} The retrospective series of cases published so far include patients from both the rituximab and the pre-rituximab era, and demonstrate the main role of immunotherapy in these patients.^{1-5,9,10,17,23,24} This approach was not possible in our series, as only 8% of our patients were treated in the pre-rituximab era; therefore, a comparison between the 2 groups was not possible. The same occurs with anthracyclines, as most patients received this treatment.

Moreover, radiotherapy still plays an important role in the treatment of patients with resected disease, and specially in patients with non-aggressive tumors.^{1-5,9,10,21,22} Of note, in our series, 2 patients were treated exclusively with radiotherapy, 1 B marginal zone lymphoma and 1 small lymphocytic lymphoma, reaching full radiologic response and with no evidence of relapse during the follow-up, and thus demonstrating the effectiveness of this therapy. In our series, 3 of the 10 relapses were indolent lymphomas that had only been treated with radiation, reaching complete response. Therefore, we consider that it is likely, in selected cases of indolent lymphomas, that radiotherapy alone can be considered an effective treatment with significant rates of complete response.^{1-5,9,10,19,21,22,42}

Overall, the published series report 5-year survival rates of 80% and 5-year PFS of 77%.^{11,21,22,24,26-28} In our cohort, the 5-year OS was 76%, and the 5-year PFS was 73%, with no statistically significant differences observed in the analysis by subgroups of treatment and histology, as well as by age groups.

However, there is a trend toward improvement of survival rates for patients who have received anthracyclines and rituximab, but the reduced sample size disabled obtaining statistical differences in our results.

Despite these results, the analysis of similar studies support the use of combined chemotherapy, if possible, with anthracyclines associated with rituximab, in the management of aggressive lymphomas, with subsequent assessment of consolidation of radiotherapy treatment. Several retrospective studies show rates of relapse in the central nervous system (CNS) of 5% to 15%. Aviv et al analyzed the published series, and the overall rate of CNS relapse was 8%. CNS prophylaxis is controversial and should only be considered in high-risk patients, namely patients with stage IIE, tumors > 5 cm, and aggressive histology.^{1-5,8-11,15,42-46} Exclusive radiotherapy treatment can be recommended in patients with indolent histology and without bulky disease and has demonstrated a significant impact on both OS and PFS rates. On the other hand, surgery has been demonstrated to have no impact on PFS or OS,^{20,38,43,47} and therefore, its use should be relegated to patients where biopsies are negative or not conclusive.

With regard to the small percentage of patients with HL PBL, they must follow the recommended ABVD (doxorubicin, bleomycin, vinblastine, dacarbazine) scheme and assess the consolidation radiotherapy treatment, according to stages I or II, and whether or not they reached complete remission after chemotherapy. Two of our patients with HL (1 nodular sclerosing type and the other rich in lymphocytes) were treated with ABVD with complete response and were relapse-free after 2 years of follow-up.

Conclusion

The diffuse large B-cell lymphoma, in our series, remains the most frequent histologic subtype of PBL. Although there is a lack of a standard treatment of PBL, our results suggest that the optimal treatment may be chemotherapy combined with adjuvant radiotherapy. Some indolent lymphomas could be treated with exclusive radiotherapy, reaching an adequate control of the disease, low morbidity, and with a significant impact on survival rates.

Clinical Practice Points

- PBL is a rare form of presentation of extranodal lymphoid neoplasm.
- The management of primary breast NHL is generally determined by the histologic subtype and extent of disease.
- Systemic treatment with chemotherapy remains the basis of management of PBL; however, radiotherapy treatment still plays an important role in the management of patients with resected disease, and even in patients with nonaggressive tumors.
- Indolent lymphomas can be treated with exclusive radiotherapy, reaching an adequate control of the disease.

Disclosure

The authors have stated that they have no conflicts of interest.

Primary Breast Lymphoma in Spain

References

- Validire P, Capovilla C, Asselain B, et al. Primary breast non-Hodgkin's lymphoma: a large single center study of initial characteristics, natural history, and prognostic factors. *Am J Hematol* 2009; 84:133-9.
- Yhim HY, Kang HJ, Choi YH, et al. Clinical outcomes and prognostic factors in patients with breast diffuse large B cell lymphoma: Consortium for Improving Survival of Lymphoma (CISL) study. *BMC Cancer* 2010; 10:321.
- Fruchart C, Denoux Y, Chasle J, et al. High grade primary breast lymphoma: is it a different clinical entity? *Breast Cancer Res Treat* 2005; 93:191-8.
- Aviv A, Tadmor T, Polliack A. Primary diffuse large B-cell lymphoma of the breast: looking at pathogenesis, clinical issues and therapeutic options. *Ann Oncol* 2013; 24:2236-44.
- Martinelli G, Ryan G, Seymour JF, et al. Primary follicular and marginal-zone lymphoma of the breast: clinical features, prognostic factors and outcome: a study by the International Extranodal Lymphoma Study Group. *Ann Oncol* 2009; 20:1993-9.
- Wiseman C, Liao K. Primary lymphoma of the breast. *Cancer* 1972; 29:1705-12.
- Hugh JC, Jackson F, Hanson J, Poppema S. Primary breast lymphoma. An immunohistologic study of 20 new cases. *Cancer* 1990; 66:2602-11.
- Giardini R, Piccolo C, Rilke F. Primary non-Hodgkin's lymphomas of the female breast. *Cancer* 1992; 69:725-35.
- Ryan G, Martinelli G, Kuper-Hommel M, et al. Primary diffuse large B-cell lymphoma of the breast: prognostic factors and outcomes of a study by the International Extranodal Lymphoma Study Group. *Ann Oncol* 2008; 19:233-41.
- Cheah CY, Campbell B, Seymour J. Primary breast lymphoma. *Cancer Treat Rev* 2014; 40:900-8.
- Niitsu N, Okamoto M, Nakamine H, Hirano M. Clinicopathologic features and treatment outcome of primary breast diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Res* 2008; 32:1837-41.
- Lin YC, Tsai CH, Wu JS, et al. Clinicopathologic features and treatment outcome of non-Hodgkin lymphoma of the breast — a review of 42 primary and secondary cases in Taiwanese patients. *Leuk Lymphoma* 2009; 50:918-24.
- Kuper-Hommel M, Snijder S, Janssen-Heijnen M, et al. Treatment and survival of 38 female breast lymphomas: a population-based study with clinical and pathological reviews. *Ann Hematol* 2003; 82:397-404.
- Gualco G, Chioato L, Harrington W, Weiss L, Bacchi C. Primary and secondary t-cell lymphomas of the breast: clinico-pathologic features of 11 cases. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2009; 17:301-6.
- Liu MT, Hsieh CY, Wang AY, et al. Primary breast lymphoma: a pooled analysis of prognostic factors and survival in 93 cases. *Ann Saudi Med* 2005; 25:288-93.
- Gao Q, Zhang X, Xiang H, Ren G, Zheng Y. Primary breast T-cell lymphoma, unspecified, treated with autologous peripheral blood stem cell transplantation: a case report and literature review. *Oncol Lett* 2014; 7:156-8.
- Avilés A, Castañeda C, Neri N, Cleto S, Nambo M. Rituximab and dose dense chemotherapy in primary breast lymphoma. *Haematologica* 2007; 92:1147-8.
- Avilés A, Delgado S, Nambo M, Neri N, Murillo E, Cleto S. Primary breast lymphoma: results of a controlled clinical trial. *Oncology* 2005; 69:256-60.
- Radkani P, Joshi D, Paramo J, Mesko T. Primary breast lymphoma: 30 years of experience with diagnosis and treatment at a single medical center. *JAMA Surg* 2014; 149:91-3.
- Avenia N, Sanguinetti A, Cirocchi R, et al. Primary breast lymphomas: a multicentric experience. *World J Surg Oncol* 2010; 8:53.
- Caon J, Wai E, Hart J, et al. Treatment and outcomes of primary breast lymphoma. *Clin Breast Cancer* 2012; 12:412-9.
- Zhao S, Zhang QY, Ma WJ, et al. Analysis of 31 cases of primary breast lymphoma: the effect of nodal involvement and microvascular density. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2011; 11:33-7.
- Yhim HY, Kim JS, Kang HJ, et al. Matched-pair analysis comparing the outcomes of primary breast and nodal diffuse large B-cell lymphoma in patients treated with rituximab plus chemotherapy. *Int J Cancer* 2012; 131:235-43.
- Hosein P, Maragulia J, Salzberg M, et al. A multicentre study of primary breast diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era. *Br J Haematol* 2014; 165:358-63.
- Jinming X, Qi Z, Xiaoming Z, Jianming T. Primary non-Hodgkin's lymphoma of the breast: mammography, ultrasound, MRI and pathologic findings. *Future Oncol* 2012; 8:105-9.
- Gholam D, Bibeau F, El Weshi A, Bosq J, Ribrag V. Primary breast lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2003; 44:1173-8.
- Guo HY, Zhao XM, Li J, Hu XC. Primary non-Hodgkin's lymphoma of the breast: eight-year follow-up experience. *Int J Hematol* 2008; 87:491-7.
- Wong W, Schild S, Halyar M, Schomberg P. Primary non-Hodgkin lymphoma of the breast: the Mayo Clinic experience. *J Surg Oncol* 2002; 80:19-25.
- Sabaté JM, Gómez A, Torrubia S, et al. Lymphoma of the breast: clinical and radiologic features with pathologic correlation in 28 patients. *Breast J* 2002; 8:294-304.
- Lyou CY, Yang SK, Choe DH, Lee BH, Kim KH. Mammographic and sonographic findings of primary breast lymphoma. *Clin Imaging* 2007; 31:234-8.
- Sousaris N, Barr G. Sonoelastography of breast lymphoma. *Ultrasound Q* 2016; 32:201-11.
- Yang WT, Lane D, Le-Petross H, Abruzzo L, Macapinlac H. Breast lymphoma: imaging findings of 32 tumors in 27 patients. *Radiology* 2007; 245:692-702.
- Santra A, Kumar R, Reddy R, et al. FDG PET-CT in the management of primary breast lymphoma. *Clin Nucl Med* 2009; 34:848-53.
- Talwalkar S, Miranda R, Valbuena J, Routbort M, Martin A, Medeiros L. Lymphomas involving the breast: a study of 106 cases comparing localized and disseminated neoplasms. *Am J Surg Pathol* 2008; 32:1299-309.
- Yoshida S, Nakamura N, Sasaki Y, et al. Primary breast diffuse large B-cell lymphoma shows a non-germinal center B-cell phenotype. *Mod Pathol* 2005; 18:398-405.
- Taniguchi K, Katsuyoshi T, Chuang S, et al. Frequent MYD88 L265P and CD79B mutations in primary breast diffuse large b-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol* 2016; 40:324-34.
- Jennings W, Baker R, Murray S, et al. Primary breast lymphoma: the role of mastectomy and the importance of lymph node status. *Ann Surg* 2007; 245:784-9.
- Miranda R, Aladily T, Miles H, et al. Breast implant-associated anaplastic large-cell lymphoma: long-term follow-up of 60 patients. *J Clin Oncol* 2014; 32:114-20.
- Lauren D, Delas A, Gaulard P, et al. Breast implant-associated anaplastic large cell lymphoma: two distinct clinicopathological variants with different outcomes. *Ann Oncol* 2016; 27:306-14.
- Newman M, Zimmel N, Bandak A, Kaplan B. Primary breast lymphoma in a patient with silicone breast implants: a case report and review of the literature. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2008; 61:822-5.
- Avilés A, Neri N, Nambo J. The role of genotype in 104 cases of diffuse large b-cell lymphoma primary of breast. *Am J Clin Oncol* 2012; 35:126-9.
- Fukuhara S, Watanabe T, Munakata W, et al. Bulky disease has an impact on outcomes in primary diffuse large B-cell lymphoma of the breast: a retrospective analysis at a single institution. *Eur J Haematol* 2011; 87:434-40.
- Ganjoo K, Advani R, Rajan M, McMillan A, Horning S. Non-Hodgkin lymphoma of the breast. *Cancer* 2007; 110:25-30.
- Mouna B, Saber B, Tijani el H, Hind M, Amina T, Hassan E. Primary malignant non-Hodgkin's lymphoma of the breast: a study of seven cases and literature review. *World J Surg Oncol* 2012; 10:151.
- Bierman P, Villanueva M, Armitage O. Diffuse large B-cell lymphoma of the breast: a distinct entity? *Ann Oncol* 2008; 19:201-2.
- Jeanneret-Sozzi W, Taghian A, Epelbaum R. Primary breast lymphoma: patient profile, outcome and prognostic factors. A multicentre Rare Cancer Network study. *BMC Cancer* 2008; 8:86.
- Lokesh KN, Sathyanarayanan V, Lakshmiah KC, Suresh T, Govinda K, Lokanatha D. Primary breast diffuse large B cell lymphoma — report of 6 cases from South India with review of literature. *Indian J Surg Oncol* 2013; 4:368-73.

Mutational profile of primary breast diffuse large B-cell lymphoma

Fernando Franco^{1,2}, Julia González-Rincón^{3,4}, Javier Lavernia^{2,5}, Juan F. García⁶, Paloma Martín^{4,7}, Carmen Bellas^{4,7}, Miguel A. Piris^{4,8}, Lucia Pedrosa³, José Miramón^{2,9}, José Gómez-Codina^{2,10}, Delvys Rodríguez-Abreu^{2,11}, Isidro Machado¹², Carmen Illueca¹², Jesús Alfaro^{2,13}, Mariano Provencio^{1,2,*} and Margarita Sánchez-Beato^{2,3,*}

¹Medical Oncology Department, Hospital Universitario Puerta de Hierro, Madrid, Spain

²GOTEL (Spanish Lymphoma Oncology Group)

³Group of Research in Lymphomas, Medical Oncology Department, Instituto de Investigación Sanitaria Puerta de Hierro-Segovia de Arana, Madrid, Spain

⁴Centro de Investigación Biomédica en Red de Cáncer (CIBERONC), Madrid, Spain

⁵Medical Oncology Department, Instituto Valenciano de Oncología, Valencia, Spain

⁶Pathology Department, MD Anderson Cancer Center, Madrid, Spain

⁷Pathology Department, Hospital Universitario Puerta de Hierro, Madrid, Spain

⁸Pathology Department, Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain

⁹Medical Oncology Department, Hospital Serranía de Ronda, Málaga, Spain

¹⁰Medical Oncology Department, Hospital Universitari i Politècnic La Fe, Valencia, Spain

¹¹Medical Oncology Department, Hospital Universitario Insular de Gran Canaria, Las Palmas, Spain

¹²Pathology Department, Instituto Valenciano de Oncología, Valencia, Spain

¹³Medical Oncology Department, Instituto Oncológico de Kutxa, Donostia, Spain

* Joint senior authors

Correspondence to: Margarita Sánchez-Beato, email: msbeato@idiphim.org

Keywords: primary breast lymphoma; diffuse large B-cell lymphoma; cell of origin; NFkB pathway; PIM1

Received: August 09, 2017

Accepted: October 03, 2017

Published: October 24, 2017

Copyright: Franco et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License 3.0 (CC BY 3.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

ABSTRACT

Primary breast lymphoma is a rare form of extra-nodal lymphoid neoplasm. The most common histological type is the diffuse large B-cell lymphoma, which represents 60–80% of all the cases. Our study analyzes the mutational profile of the primary lymphoma of the breast through targeted massive sequencing with a panel of 38 genes in a group of 17 patients with primary breast diffuse large B-cell lymphoma. Seventy-point-five percent of the patients presented with stage IE and 29.5% with stage IIE. 44% of the cases correspond to lymphomas with germinal center phenotype and 33.3% to activated B-cell. The genes with a higher mutational frequency include *PIM1* (in 50% of the analyzed samples), *MYD88* (39%), *CD79B*, *PRDM1* and *CARD11* (17%), *KMT2D*, *TNFIAP3* and *CREBBP* (11%). The profile of mutant genes involves mostly the NFkB signaling pathway. The high frequency of mutations in *PIM1* compared with other lymphomas may have implications in the clinical presentation and evolution of this type of lymphoma.

INTRODUCTION

Primary breast lymphoma (PBL) is a rare form of extra-nodal lymphoid neoplasm. It represents 1% of non-Hodgkin's lymphomas (NHL) and 2.2% of extra-nodal lymphomas. PBL usually presents as a painless mass of progressive growth with or without ipsilateral axillary lymph nodes and more than 96% of the cases affect to women [1–3]. It was first described in 1972 by Wiseman and Liao [4], who defined diagnostic criteria, which would be later modified by Hugh *et al* [5], defining the PBL as the infiltration of breast tissue by lymphoma with or without regional lymph node in patients without a history of prior nodal or extra-nodal lymphoma and systemic disease at the time of diagnosis. More than 95% of the cases correspond to B-type NHL and the most common histopathological type is diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), which represents 60–80% of all the cases. Other less frequent subtypes include follicular lymphoma and marginal zone lymphoma MALT-type [5–6]. The treatment of primary breast DLBCL (PB-DLBCL) is based on regimes like R-CHOP (Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, Prednisone and Rituximab) or similar treatments. In the Rituximab era an overall survival (OS) at 5 years may reach 87% [6–9]. The genetic alterations of PB-DLBCL have not been previously analyzed, except for the study from Taniguchi *et al* regarding *MYD88* and *CD79B* [10], partly due to the infrequency of this presentation and the difficulty in obtaining sufficient tumor tissue to perform molecular analysis. Our objective is, therefore, to contribute to the knowledge on the mutational landscape of PB-DLBCL.

RESULTS

The study population consists of 17 patients, all women, with PB-DLBCL diagnosed between 1993 and 2016 in different medical centers in Spain. The average age of diagnosis was 66 years (range, 29–84) (Table 1). In nine cases, the left breast was involved; in 7 cases the right one and both in one case. Seventy-point-five percent of the patients presented with stage IE and 29.5% stage IIE. All patients received immunochemotherapy (R-CHOP or similar), except one who was treated with CHOP. All the patients achieved complete response (CR) (Table 1). There were 2 relapses in the contralateral breast, both treated with second-line regimens that achieved CR. From one of these patients we confirmed the diagnosis and acquired the relapsing samples. There were also 1 systemic nodal relapse and 1 brain relapse, both of which died from disease progression. The median progression free survival (PFS) was 7 years and the median OS was 16 years.

Forty-four-point-four percent of the analyzed samples were classified, according to Hans's algorithm

(see Materials and Methods), as germinal center B-cell (GCB) DLBCL, 33.3% as non-GCB, while 16.6% were unclassified (Table 2). The proliferation index, determined by Ki-67 expression, was higher than or equal to 80% in 16/18 samples; only samples from patients 2 and 3 showed values of Ki67 expression of 57 and 70%, respectively.

We designed a targeted sequencing panel for aggressive B-cell lymphomas including 38 recurrently mutated genes described in the literature (Supplementary Table 1) [11–14]. TruSeq® Custom Amplicon Low Input Library for dual-strand sequencing (Illumina Inc. San Diego CA, USA) was used. Median coverage for the amplicons for pool A was 379× (50–1098×) and pool B was 426× (30–2149×). After sequencing 18 samples from the 17 patients included in the study, we found a total of 52 non-synonymous and 21 synonymous mutations; at least 1 mutated gene (taking into account exclusively missense, nonsense, frameshift and splicing mutations) were found in 15 of them. Samples 5, 12a and 13 had the highest numbers of mutated genes, with 4, 6 and 7 respectively (Figure 1, Table 3 and Supplementary Table 2). Some cases had more than one mutation per gene. We identified mutations in 14 of the 38 selected genes (*PIMI*, *MYD88*, *KMT2D*, *CARD11*, *CD79B*, *PRDM1*, *ATM*, *BRAF*, *CREBBP*, *TNFAIP3*, *CCND3*, *PLCG2*, *TCF3* and *STAT3*) (Figure 1, Table 3 and Supplementary Table 2). The recurrently mutated genes were *PIMI* (in 9/18 samples; 50%), *MYD88* (7/18, 39%), *CD79B*, *PRDM1* and *CARD11* (3/18; 17%), *KMT2D*, *TNFAIP3* and *CREBBP* (2/18; 11%) (Figure 1, Table 3 and Supplementary Tables 2 and 3).

The high frequency of *PIMI* mutations is one of the most relevant findings of this study. We have identified 21 non-synonymous and 20 synonymous *PIMI* mutations in 9 samples. Many of the non-synonymous mutations of *PIMI* affected mainly to the serine/threonine dual specificity protein kinase, catalytic domain (aa 38–290). *MYD88* is the second most frequently mutated gene in this series, and all the cases showed the L265P mutation. The four mutations found in *CD79B* (one case showing 2 mutations) were located in exons 5 and 6 affecting the ITAM domain (aa 185–213), two of them affecting the tyrosine Y196 (Table 3 and Supplementary Table 2).

For one patient (patient number 12), who was diagnosed of PBL on the right breast in 2010 and then of a contralateral relapse in 2015, we sequenced both samples and found that they only shared the L265P-MYD88 mutation and a synonymous one in *PIMI* (Table 3 and Supplementary Table 2). The rest of the mutated genes (*CREBBP*, *ATM*, *BRAF* and *STAT3*) and most mutations in *PIMI*, were different. This may suggest that both tumors share a common precursor, but they followed completely different paths of evolution, giving rise to different lymphomas.

Table 1: Clinical data of PB-DLBCL patients

Patient	Age	Laterality	Nodal involvement	Stage	IPI	Chemo-therapy	Cycles	Radio-therapy	Response to treatment	Relapse	Treatment	Time to progression	Response to treatment
01	84	Left	No	IE	2	R-CVP	5	Yes	CR				
02	78	Right	No	IE	1	R-CHOP	4	No	CR				
03	74	Left	No	IE	2	R-CHOP	4	No	CR				
04	40	Right	Yes	IIE	0	R-CHOP	4	Yes	CR				
05	60	Left	No	IE	1	R-CHOP	8	No	CR				
06	29	Right	No	IE	0	R-CHOP	6	No	CR				
07	78	Bilateral	Yes	IIE	1	R-CHOP	6	No	CR				
08	73	Left	No	IE	2	CHOP	6	No	CR				
09	75	Left	No	IE	1	R-CHOP	4	No	CR				
10	79	Left	No	IE	2	R-CHOP	6	No	CR				
11	83	Right	Yes	IIE	2	R-MVP	6	No	CR	Nodal	No treatment	7 m	Progression
12	70	Right	No	IE	1	R-CHOP	6	No	CR	Contralateral breast	R-ESHAP	80 m	CR
13	79	Left	No	IE	1	R-CHOP	4	Yes	CR				
14	62	Right	No	IE	1	R-CHOP	4	Yes	CR	Brain	Methotrexate	23 m	Progression
15	70	Left	No	IE	2	R-CHOP	6	No	CR				
16	46	Left	Yes	IIE	ND	R-CHOP	6	No	CR				
17	42	Right	Yes	IIE	ND	R-CHOP	6	Yes	CR	Contralateral breast	R-COMP	157 m	CR

Abbreviations: R-CVP: Rituximab, Cyclophosphamide, Vincristine, Prednisone; R-CHOP: Rituximab, Cyclophosphamide, Doxorubicin, Prednisone; R-MVP: Rituximab, Methotrexate, Vincristine, Procarbazine; R-COMP: Rituximab, Cyclophosphamide, Myocet, Prednisone; R-ESHAP: Rituximab, Etoposide, Methylprednisolone, Cytarabine, Cisplatin; CR: Complete response; ND: No data; m: months

DISCUSSION

In the last twenty years multiple PBL retrospective clinical studies were published including one randomized clinical trial [1–10, 15–16]. However, only two molecular studies, both in oriental population (China and Japan), has been reported [10, 17]. The clinical profile of the patients in this series presented a great deal of similarities with previously published ones (clinical presentation, burden of disease, age and response to treatment), with an average age of 66 years [1–10].

The classification of the cell of origin (COO) by IHC showed that 44% of the samples were GCB, and 33.3% non-GCB. We could not classified 16.6% of them. This results are similar to others series of PB-DLBCL [10, 15, 17–19]. The proliferation index, determined by Ki-67 expression, is strikingly high in these samples, higher than or equal to 80% in 16/18 samples. Previous publications of PBL described the Ki-67 index in a range between 70–90% [9,10, 15, 18, 19].

The high frequency of *PIMI* mutations is one of the most relevant findings of this study. *PIMI* is a gene frequently targeted by aberrant somatic hypermutation [20], but many of the non-synonymous mutations identified in this study were located in the serine/threonine dual specificity protein kinase, catalytic domain (aa 38–290). One of these

mutations (p.H68Y) has been previously reported to increase the activity of the enzyme, compared to the wild-type [20]. Others such as those in aa L184, L182, S146 and P125, previously described [21], have been shown not to affect the catalytic activity of the protein. The importance of *PIMI* in the development and evolution of hematologic malignancies, especially in lymphomas, has been known for many years [11, 22–23]. Our results show a higher frequency of mutations in *PIMI* (50%) compared with other lymphomas of nodal (12–30%) [13–14] or extra-nodal origin (22–25%) [24–26], which may have implications in the clinical presentation and course of this type of lymphoma. Several studies have explored Pim kinases as a new target for pharmacological inhibition in cancer therapy, including multiple hematologic malignancies and suggest that PB-DLBCL could also benefit by this strategy as demonstrated previously [21, 27–29].

MYD88 is the second most frequently mutated gene in this series. The seven mutated cases had the L265P mutation, which is the most recurrently found *MYD88* mutation, it has been demonstrated to be an activating mutation leading to NFkB activation [30–33] and more frequently found in non-GCB DLBCL [34–35]. The four mutations found in *CD79B* were in exons 5 and 6 affecting the ITAM domain (aa 185–213). Two of them affected the tyrosine Y196 that was also demonstrated to

Table 2: Immunohistochemical results and cell of origin (COO) determined according to Hans’s algorithm in PB-DLBCL

SAMPLE	CD10	CD20	BCL6	BCL2	MUM1	Ki67	COO
01	+	+	+	+	ND	96%	GCB
03	–	+	+	+	–	70%	GCB
04	+	+	+	–	–	80%	GCB
05	+	+	+	+	ND	80%	GCB
06	ND	+	+	+	–	80%	GCB
07	ND	+	+	+	–	90%	GCB
08	–	+	+	+	–	80%	GCB
09	–	+	+	+	–	85%	GCB
02	–	+	–	+	ND	59%	Non-GCB
10	–	+	+	+	+	80%	Non-GCB
11	–	+	–	–	+	100%	Non-GCB
12a	ND	+	ND	ND	ND	98%	ND
12b	–	+	+	+	+	98%	Non-GCB
15	ND	+	+	+	+	80%	Non-GCB
16	–	+	+	+	+	80%	Non-GCB
17	–	+	+	+	+	80%	Non-GCB
13	ND	+	ND	ND	ND	90%	ND
14	–	+	+	+	ND	100%	ND

GCB: germinal center B-cell; non-GCB: non-germinal center B-cell, ND: No data.

be a gain-of-function mutation involved in the activation of the BCR- NFkB pathway [31]. Mutations in *CARD11* affected the coiled coil and CARD (caspase recruitment) domains and mutations in these domains is a frequent event in DLBCL and have been shown also to activate NFkB in DLBCL cases [31, 36–39].

This is the first study describing a mutational profile of PBL. The study of Taniguchi *et al* [10] was the first

to analyze *MYD88* and *CD79B* in a group of 48 patients with lymphomas of the breast. Twenty-eight of them met the diagnostic criteria for PB-DLBCL, according to the authors. Eighteen patients had systemic lymph node involvement or other extra-nodal sites (ovaries, central nervous system, bone marrow, and spleen). The frequencies of the mutations were 58% for *MYD88* and 33% for *CD79B*. These higher frequencies in Taniguchi

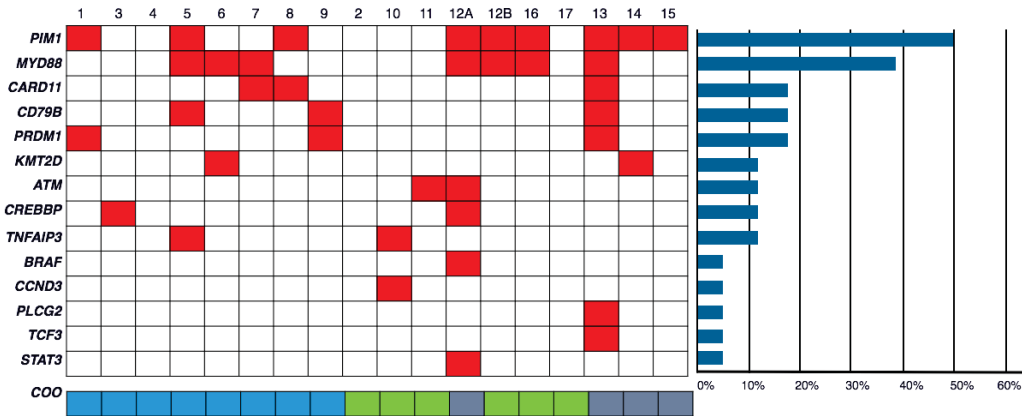


Figure 1: Frequencies and distribution of gene mutations in PB-DLBCL, and cell of origin (CCO). A total of 18 PB-DLBCL samples were subjected to targeted massive paralleled sequencing for 38 frequently mutated genes in DLBCL. Columns represent samples and the rows represent the mutated genes. Colored box (red) indicates at least 1 mutation in the given gene. The bottom row shows the COO for each sample (blue: GCB; green: non-GCB; grey: no data). Patient number 12 had two samples (12a, taken at the time of diagnosis, and 12b at the time of relapse). The horizontal bars at the right of the figure represents percentage of mutated samples.

Table 3: Non-synonymous somatic variants identified in PB-DLBCL samples

Sample	Position	Ref/Alt	Gene	Function	Exon	CDS change	aa change
1	6:37140780	G/A	PIM1	missense	exon5	c.G616A	p.V206M
	6:106536093	C/CTCCA	PRDM1	frameshift_variant	exon2	c.60_61insCCGGCT	p.Ser21fs
3	16:3820828	G/A	CREBBP	missense	exon14	c.C2623T	p.P875S
	17:62006799	A/G	CD79B	missense	exon5	c.T586C	p.Y196H
	3:38182641	T/C	MYD88	missense	exon5	c.T794C	p.L265P
5	6:37138405	C/A	PIM1	missense	exon1	c.C54A	p.N18K
	6:37138427	G/A	PIM1	missense	exon1	c.G76A	p.A26T
	6:37139097	G/A	PIM1	missense	exon4	c.G437A	p.S146N
	6:37139180	C/T	PIM1	missense	exon4	c.C520T	p.L174F
	6:138200190	C/A	TNFAIP3	stopgain	exon7	c.C1608A	p.C536X
6	12:49420433	G/A	KMT2D	missense	exon48	c.C15316T	p.R5106C
	3:38182641	T/C	MYD88	missense	exon5	c.T794C	p.L265P
7	7:2978320	C/T	CARD11	missense	exon7	c.G1010A	p.R337Q
	3:38182641	T/C	MYD88	missense	exon5	c.T794C	p.L265P
8	7:2987341	G/A	CARD11	missense	exon3	c.C88T	p.R30W
	6:37139033	C/T	PIM1	missense	exon4	c.C373T	p.P125S
9	17:62006797	G/C	CD79B	stopgain	exon5	c.C588G	p.Y196X
	6:106536235	G/A	PRDM1	missense	exon2	c.G202A	p.D68N
10	6:41903731	G/A	CCND3	stopgain	exon5	c.C826T	p.Q276X
	6:138200458	C/CT	TNFAIP3	frameshift_variant	exon7	c.1876_1877insT	p.Leu626fs
11	11:108172446	G/A	ATM	stopgain	exon35	c.G5249A	p.W1750X
12a	11:108119789	C/T	ATM	missense	exon9	c.C1195T	p.H399Y
	7:140482915	G/A	BRAF	missense	exon10	c.C1220T	p.P407L
	16:3788614	G/A	CREBBP	missense	exon26	c.C4340T	p.T1447I
	3:38182641	T/C	MYD88	missense	exon5	c.T794C	p.L265P
	6:37138401	G/A	PIM1	missense	exon1	c.G50A	p.C17Y
	6:37139039	C/T	PIM1	stopgain	exon4	c.C379T	p.Q127X
	17:40476822	G/A	STAT3	stopgain	exon17	c.C1507T	p.Q503X
12b	3:38182641	T/C	MYD88	missense	exon5	c.T794C	p.L265P
	6:37138625	C/G	PIM1	stopgain	exon2	c.C159G	p.Y53X
	6:37138946	G/C	PIM1	missense	exon4	c.G286C	p.V96L
	6:37139210	C/T	PIM1	missense	exon4	c.C550T	p.L184F
13	7:2977612	A/T	CARD11	missense	exon8	c.T1072A	p.C358S
	17:62006647	A/G	CD79B	missense	exon6	c.T629C	p.I210T
	17:62006680	A/T	CD79B	missense	exon6	c.T596A	p.L199Q
	3:38182641	T/C	MYD88	missense	exon5	c.T794C	p.L265P
	6:37138808	G/T	PIM1	splice_donor_variant			
	6:37138597	TGGGCAGCGCG/T	PIM1	frameshift_variant	exon2	c.132del11	p.Leu44fs
	6:37139029	CGAGCCGGT/C	PIM1	frameshift_variant	exon4	c.370delGAGCCGGT	p.Glu124fs
	6:37139210	C/T	PIM1	missense	exon4	c.C550T	p.L184F
	16:81929465	C/T	PLCG2	missense	exon13	c.C1126T	p.R376W
	6:106536324	G/C	PRDM1	missense	exon2	c.G291C	p.E97D
14	19:1622393	C/T	TCF3	missense	exon9	c.G571A	p.E191K
	12:49440169	C/T	KMT2D	missense	exon16	c.G4457A	p.G1486D
	12:49433401	C/T	KMT2D	splice_acceptor_variant	intron31		
	6:37138424	C/G	PIM1	missense	exon1	c.C73G	p.L25V

15	6:37138769	C/T	PIM1	missense	exon3	c.C202T	p.H68Y
	6:37138976	C/T	PIM1	missense	exon4	c.C316T	p.L106F
16	3:38182641	T/C	MYD88	missense	exon5	c.T794C	p.L265P
	6:37138354	G/A	PIM1	start_lost	exon1	c.G3A	p.M1I
	6:37138916	G/C	PIM1	missense	exon4	c.G256C	p.V86L
	6:37139204	C/T	PIM1	missense	exon4	c.C544T	p.L182F

Ref, reference base; Alt, altered base; CDS, coding sequence; aa, aminoacid.

series could be due to the highest sensitivity of the technique they used, digital polymerase chain reaction, and/or may reflect differences in the prevalence of etiological factors in Spanish and Japanese cohorts. Studies in others extra-nodal lymphomas, such as central nervous system and testis lymphomas, also showed *MYD88*, *CD79B* and *PIM1* as the most frequently mutated genes, and points out a common molecular profile for extra-nodal DLBCL [24–26]. Recently, a study described the mutational frequency of *MYD88* and *CD79B* in seven PB-DLBCL cases [17]. In this study 5 patients presented mutations in *MYD88* (L265P mutation in 4 cases and 1 case the L265S mutation) and 4 patients presented mutations in *CD79B* (Y196N, Y196H and Y196D). Only 2 of the 7 patients with PB-DLBCL showed mutations in both genes.

The most frequently mutated genes (*PIM1*, *MYD88*, *CD79B*, and *CARD11*) are more prevalent in non-GCB DLBCL as has been addressed in previous publications in both extra-nodal and nodal lymphomas [12, 39–41] (Figure 2). This point out to NFkB as the main pathway targeted for mutations in PB-DLBCL pathogenesis. Activating mutations in *CD79B*, *CARD11* and *MYD88* and inactivation mutations in *TNFAIP3*, leading to activation of NFkB pathway constitute the hallmark of ABC-like DLBCL as has been reported in multiple publications [34, 35, 40]. This activation of NFkB is a characteristic mainly, although not exclusively, of ABC-DLBCL [13–14, 28–31, 38] (Figure 3). Mutations in other genes such as *MLL2/KMT2D* and *CREBBP* have been associated both to GCB and to non-GCB DLBCL [11, 12, 14, 34, 35, 41]. Although, in this series we did not see a clear association between the mutated genes with the COO determined by IHC, several previous studies show that COO classification, using the Hans method, only a variable percentage of cases showed concordance with gene expression profiling classification [42]. In fact, the pattern of mutations in PB-DLBCL seems to converge to NFkB activation, typical of the ABC phenotype. Finally, the presence of altered *MYD88*, *CD79B* and *PIM1* suggests new therapeutic opportunities for PB-DLBCL using drugs like lenalidomide, BCR, NFkB or PIM inhibitors.

MATERIALS AND METHODS

Patients and samples

The study population consists of 17 patients, all women, with PB-DLBCL diagnosed between 1993 and 2016 in different medical centers in Spain. The research project was approved by the Ethics Committee of Puerta de Hierro University Hospital (Majadahonda, Spain) and conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. Samples and clinical data were collected, processed and stored according to quality protocols, ensuring the safety and confidentiality of donors' data. The collected data included sex, age, tumor stage, laterality, treatment, relapse, PFS and OS (Supplementary Table 1). Clinical data were analyzed according to the modified criteria of Wiseman and Liao [4–5], and the histologic classification of the World Health Organization, 2008. We reviewed the biopsies in a single center to confirm the diagnosis; the COO was determined by IHC data using Hans algorithm.

Massive parallel sequencing

We designed a targeted sequencing panel for aggressive B-cell lymphomas including 38 recurrently mutated genes described in the literature [11–14] (Supplementary Table 1).

TruSeq® Custom Amplicon Low Input Library for dual-strand sequencing (Illumina Inc. San Diego CA, USA) was used. Dual-strand sequencing eliminates false C-T mutations that can arise from deamination during formalin fixation. The probes for this custom panel were designed with DesignStudio (Illumina) and consisted of 1399 amplicons with an average size of 175 bp and a cumulative targeted region of 140 kb. Polymorphisms were avoided in the design of the primers.

DNA was extracted from formalin fixed and paraffin embedded tissues (FFPET) with truXTRACT FFPE DNA kit (Covaris, Woburn MA USA). Target enrichment was performed according to manufacturer's instructions. Total amount of input DNA per library ranged from 30 to 100 ng. After library preparation, indexing and bead purification, the libraries (two different libraries per sample, one per strand) were quantified by Qubit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and then

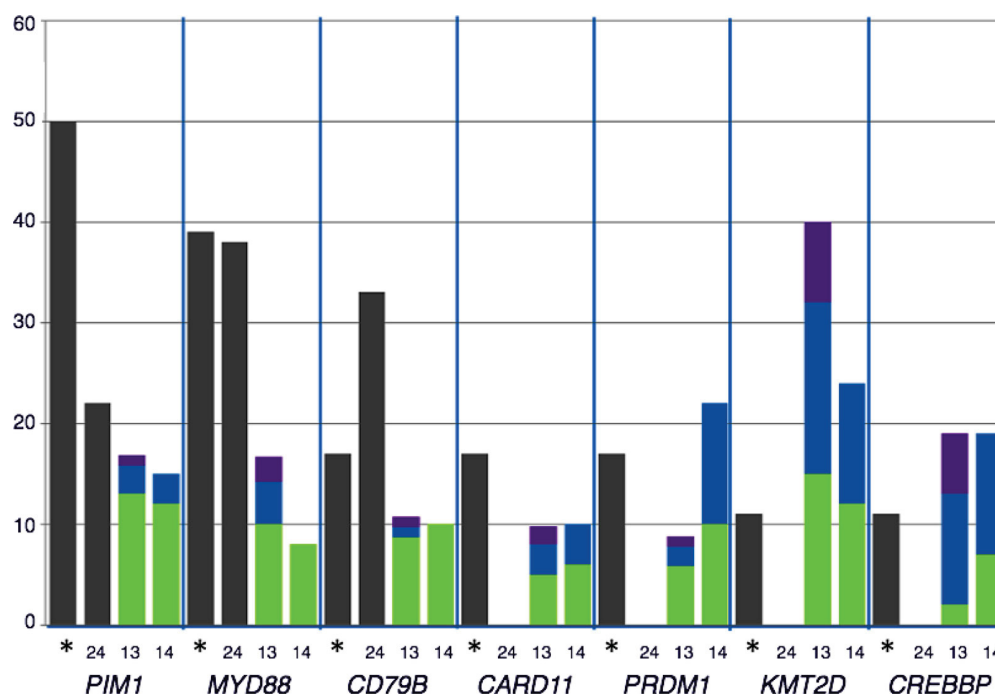


Figure 2: Comparison of the distribution of recurrently mutated genes in DLBCL cohorts: The percentage of mutated cases for each gene represented were obtained from the following data: *our data; [13, 14, 24]. The distribution of mutations according to cell of origin (COO) in each series were represented when available. Grey: COO non-classified; green: non-GCB DLBCL, Blue: GCB DLBCL; purple: others

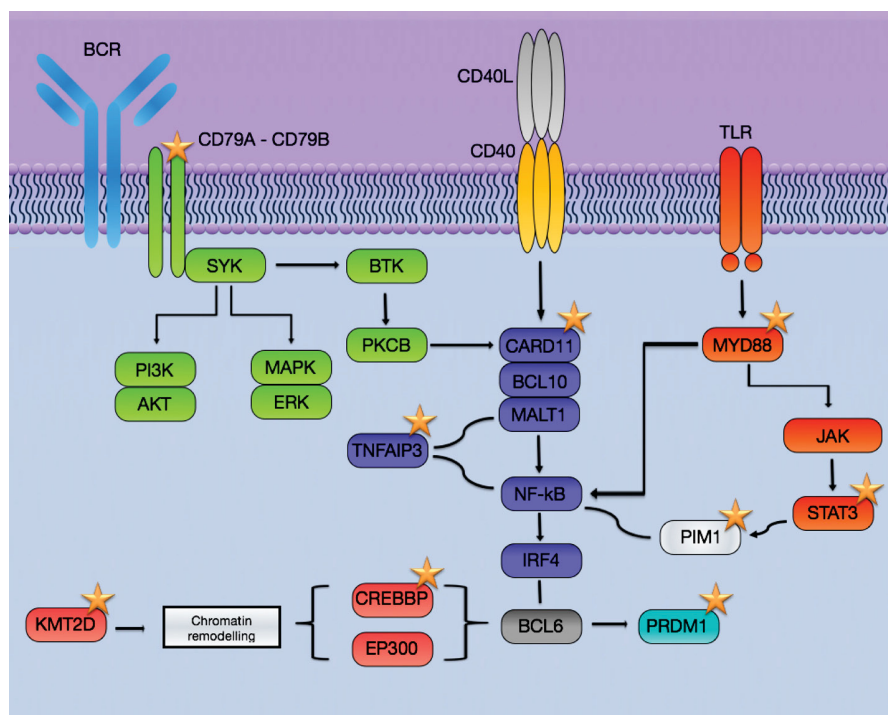


Figure 3: Schematic representation of the pathways affected in PB-DLBCL by mutations. The most frequently mutated genes involved BCR and NFkB pathways and are more prevalent in non-GCB DLBCL. Stars: recurrently mutated genes in PB-DLBCL.

normalized with beads and pooled for sequencing. The pooled libraries were sequenced with Miseq Reagent Kit V2 (paired-end, 2x150) on a MiSeq instrument (Illumina), as described in the manufacturer's protocol.

Median coverage for the amplicons for pool A was 379x (50–1098x) and pool B was 426x (30–2149x). For each sample alignment and variant calling was performed within MiSeq Reporter (Illumina) tool available in the instrument. Additionally, an independent variant calling was done with VarScan 2.4.0 [43] and annotation with Annovar [44]. All the variants identified by both complementary methods were visualized using IGV and only those mutations detected in both pool A and pool B were considered as valid.

Abbreviations

COO: Cell of origin; CR: complete response; DLBCL: diffuse large B-cell lymphoma; FFPET: formalin fixed and paraffin embedded tissues; GCB: germinal center B-cell; NHL: non-Hodgkin's lymphomas; OS: overall survival; PBL: Primary breast lymphoma; PB-DLBCL: primary breast diffuse large B-cell lymphoma; PFS: progression free survival; R-CHOP: Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, Prednisone and Rituximab.

Author contributions

FF helps to prepare the libraries for targeted sequencing, revised sequencing data, and wrote the manuscript; JG-R, performed all sequencing analysis; JL performed diagnosis, collected samples and clinical data and revised all the samples; LP analyzed data; JFG, PM, CB, MAP, JM, JG-C, DR-A, IM, CI and JA, performed diagnoses and/or provided clinical samples; MP collaborated in designing the study and supervised the project; MSB designed the study, supervised the project, and wrote the manuscript. All the authors revised and approved the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

We are indebted to the patients who have contributed to this study. We acknowledge the Biobanks from Hospital Universitario Puerta de Hierro (Majadahonda, Spain), MD Anderson Cancer Center-Madrid Hospital, and Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (Santander, Spain) as well as the pathology departments of all the centers collaborating in the study. We especially thank Sagrario Gómez de Benito from Instituto de Investigación Sanitaria Puerta de Hierro-Segovia de Arana, for their exceptional work in sample processing and libraries preparation, and Dra. E Ramil, from Sequencing Unit (Instituto de Investigación Sanitaria Puerta de Hierro), for her help.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no competing financial interests.

FUNDING

This work was supported by grants from the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), from the Spanish Ministry of Economy and Competence (MINECO), AES-FEDER (Plan Estatal de I+D+I 2008–2011 and 2013–2016: RD12/0036/0060, RD12/0036/0041, PI14/00221, PIE14/0064, CIBERONC CB16/12/00291), and ROCHE. JG-R is a recipient of a iPFIS predoctoral fellowship (IFI14/00003) from ISCIII-MINECO-AES-FEDER (Plan Estatal I+D+I 2013–2016). MSB was supported by a Miguel Servet contract (CP11/00018) from the ISCIII- MINECO-AES-FEDER (Plan Nacional I+D+I 2008–2011), and currently by a Miguel Servet II contract (CPII16/00024) from ISCIII-MINECO-AES-FEDER (Plan Estatal I+D+I 2013–2016), Spain and Fundación de Investigación Biomédica Puerta de Hierro.

REFERENCES

1. Validire P, Capovilla C, Asselain B, Kirova Y, Goudefroye R, Plancher C, Fourquet A, Zanni M, Gaulard P, Vicente-Salomon A, Decaudin D. Primary breast non-Hodgkin's lymphoma: a large single center study of initial characteristics, natural history, and prognostic factors. *Am J Hematol* 2009; 84:133–9.
2. Aviv A, Tadmor T, Polliack A. Primary diffuse large B-cell lymphoma of the breast: looking at pathogenesis, clinical issues and therapeutic options. *Ann Oncol* 2013; 24:2236–44.
3. Ryan G, Martinelli G, Kuper-Hommel M, Tsang R, Pruneri G, Yuen K, Roos D, Lennard A, Devizzi L, Crabb S, Hossfeld D, Pratt G, Dell'Olio M, et al. Primary diffuse large B-cell lymphoma of the breast: prognostic factors and outcomes of a study by the International Extranodal Lymphoma Study Group. *Ann Oncol* 2008; 19:233–41.
4. Wiseman C, Liao K. Primary lymphoma of the breast. *Cancer* 1972; 29:1705–12.
5. Hugh JC, Jackson F, Hanson J, Poppema S. Primary breast lymphoma. An immunohistologic study of 20 new cases. *Cancer* 1990; 66:2602–11.
6. Franco F, Lavernia J, Aguiar-Bujanda D, Miramón J, Gumá J, Álvarez R, Gómez-Codina J, Arroyo FG, Llanos M, Marín M, Alfaro J, Quero C, Delgado M, et al. Primary Breast Lymphoma: Analysis of 55 Cases of the Spanish Lymphoma Oncology Group. *Clin Lymphoma, Myeloma Leuk*. 2016; 17:186–191.
7. Cheah CY, Campbell B, Seymour J. Primary breast lymphoma. *Cancer Treat Rev* 2014; 40:900–8.
8. Niitsu N, Okamoto M, Nakamine H, Hirano M. Clinicopathologic features and treatment outcome of primary breast diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Res* 2008; 32:1837–41.

9. Hosein P, Maragulia J, Salzberg M, Press OW, Habermann TM, Vose JM, Bast M, Advani RH, Tibshirani R, Evens AM, Islam N, Leonard JP, Martin P, et al. A multicentre study of primary breast diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era. *Br J Haematol* 2014; 165:358–63.
10. Taniguchi K, Katsuyoshi T, Chuang S, Miyata-Takata T, Sato Y, Satou A, Hashimoto Y, Tamura M, Nagakita K, Ohnishi N, Noujima-Harada M, Tabata T, Kikuti YY, et al. Frequent MYD88 L265P and CD79B mutations in primary breast diffuse large b-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol* 2016; 40:324–34.
11. Zhang J, Grubor V, Love CL, Banerjee A, Richards KL, Mieczkowski PA, Dunphy C, Choi W, Au WY, Srivastana G, Lugar PL, Rizzieri DA, Lagoos AS, et al. Genetic heterogeneity of diffuse large B-cell lymphoma. *PNAS* 2013; 110:1398–1403.
12. Basso K, Dalla-Favera R. Germinal centres and B cell lymphomagenesis. *Nat Rev Immunol* 2015; 15:172–184.
13. Dubois S, Viailly PJ, Mareschal S, Bohers E, Bertrand P, Ruminy P, Maingonnat C, Jais JP, Peyrouze P, Figeac M, Molina TJ, Desmots F, Fest T, et al. Next-Generation Sequencing in Diffuse Large B-Cell Lymphoma Highlights Molecular Divergence and Therapeutic Opportunities: a LYSA Study. *Clin Cancer Res.* 2016; 22: 2919–2928.
14. Pasqualucci L, Trifonov V, Fabbri G, Ma J, Rossi D, Chiarenza A, Wells VA, Grunn A, Messina M, Elliot O, Chan J, Bhagat G, Chadburn A, et al. Analysis of the coding genome of diffuse large B-cell lymphoma. *Nat Genet.* 2011; 43:830–837.
15. Avilés A, Neri N, Nambo J. The role of genotype in 104 cases of diffuse large b-cell lymphoma primary of breast. *Am J Clin Oncol* 2012; 35:126–9.
16. Avilés A, Delgado S, Nambo MJ, Neri N, Murillo E, Cleto S. Primary breast lymphoma: results of a controlled clinical trial. *Oncology.* 2005; 69:256–60.
17. Cao XX, Li J, Cai H, Zhang W, Duan MH, Zhou DB. Patients with primary breast and primary female genital tract diffuse large B cell lymphoma have a high frequency of MYD88 and CD79B mutations. *Ann Hematol.* 2017.
18. Talwalkar S, Miranda R, Valbuena J, Routbort M, Martin A, Medeiros L. Lymphomas involving the breast. a study of 106 cases comparing localized and disseminated neoplasms. *Am J Surg Pathol* 2008; 32:1299–309.
19. Li D, Deng J, He H, Bu Y, Peng F, Tansg X, Wang B, Lei Y, Zhang H, Xie P. Primary breast diffuse large B-cell lymphoma shows an activated B-cell-like phenotype. *Ann Diagn Pathol* 2012; 16:335–43.
20. Kumar A, Mandiyan V, Suzuki Y, Zhang C, Rice J, Tsai J, Artis DR, Ibrahim P, Bremer R. Crystal structures of proto-oncogene kinase Pim1: a target of aberrant somatic hypermutations in diffuse large cell lymphoma. *J Mol Biol.* 2005; 348:183–93.
21. Peters TL, Li L, Tula-Sanchez AA, Pongtornpipat P, Schatz JH. Control of translational activation by PIM kinase in activated B-cell diffuse large B-cell lymphoma confers sensitivity to inhibition by PIM447. *Oncotarget.* 2016; 7:63362–63373.
22. Mondello P, Cuzzocrea S, Mian M. Pim kinases in hematological malignancies: where are we now and where are we going?. *J Hematol Oncol.* 2014; 7:95.
23. Nawijn M, Alendar A, Berns A. For better or for worse: the role of Pim oncogenes in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer.* 2011; 11:23–34.
24. Bruno A, Boisselier B, Labreche K, Marie Y, Polivka M, Jouvet A, Adam C, Figarella-Branger D, Miquel C, Eimer S, Houillier C, Soussain C, Mokhtari K, et al. Mutational analysis of primary central nervous system lymphoma. *Oncotarget.* 2014; 5:5065–5075.
25. Nakamura T, Tateishi K, Niwa T, Matsushita Y, Tamura K, Kinoshita M, Tanaka K, Fulushima S, Takami H, Arita H, Kubo A, Shuto T, Ohno M, et al. Recurrent mutations of CD79B and MYD88 are the hallmark of primary central nervous system lymphomas. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2016; 42:279–290.
26. Cao Y, Zhu T, Zhang P, Xiao M, Yi S, Yang Y, Li Q, Ling S, Wang Y, Gao L, Zhu L, Wang J, Wang N, et al. Mutations or copy number losses of CD58 and TP53 genes in diffuse large B cell lymphoma are independent unfavorable prognostic factors. *Oncotarget.* 2016; 7:83294–83307.
27. Szydłowski M, Prochorec-Sobieszek M, Szumera-Cieckiewicz A, Derezińska E, Hoser G, Wasilewska D, Szymańska-Giemza O, Jabłońska E, Białopiotrowicz E, Sewastianik T, Polak A, Czardybon W, Gałęzowski M, et al. Expression of PIM kinases in Reed-Sternberg cells fosters immune privilege and tumor cell survival in Hodgkin lymphoma. *Blood.* 2017; 01:760–702.
28. Martín-Sánchez E, Odqvist L, Rodríguez-Pinilla SM, Sánchez-Beato M, Roncador G, Domínguez-González B, Blanco-Aparicio C, García Collazo AM, Cantalapiedra EG, Fernández JP, Curiel del Olmo S, Pisonero H, Madureira R, et al. PIM kinases as potential therapeutic targets in a subset of peripheral T cell lymphoma cases. *PLoS One.* 2014; 9:e112148.
29. Gómez-Abad C, Pisonero H, Blanco-Aparicio C, Roncador G, González-Menchén A, Martínez-Climent JA, Mata E, Rodríguez ME, Muñoz-Gonzalez G, Sánchez-Beato M, Leal JF, Bischoff JR, Piris MA. PIM2 inhibition as a rational therapeutic approach in B-cell lymphoma. *Blood.* 2011; 118:5517–27.
30. Ngo VN, Young RM, Schmitz R, Jhavar S, Xiao W, Lim KH, Kohlhammer H, Xu W, Yang Y, Zhao H, Shaffer AL, Romesser P, Wright G, et al. Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature.* 2011; 470:115–9.
31. Davis RE, Ngo VN, Lenz G, Tolar P, Young RM, Romesser PB, Kohlhammer H, Lamy L, Zhao H, Yang Ym, Xu W, Shaffer AL, Wright G, et al. Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature.* 2010; 463:88–92.
32. Zheng M, Perry AM, Bierman P, Loberiza F Jr, Nasr MR, Szwajcer D, Del Bigio MR, Smith LM, Zhang W, Greiner TC. Frequency of MYD88 and CD79B mutations, and MGMT methylation in primary central nervous system diffuse large B-cell lymphoma. *Neuropathology.* 2017.
33. Lee JH, Jeong H, Choi JW, Oh H, Kim YS. Clinicopathologic significance of MYD88 L265P mutation in diffuse large B-cell lymphoma: a meta-analysis. *Sci Rep.* 2017; 7:1785.
34. Lenz G, Davis RE, Ngo VN, Lam L, George TC, Wright GW, Dave SS, Zhao Hm, Xu W, Rosenwald A, Ott G, Muller-Hermelink HK, Gascoyne RD, et al. Oncogenic CARD11 mutations in human diffuse large B cell lymphoma. *Science.* 2008; 319:1676–9.

35. Takahara T, Matsuo K, Seto M, Nakamura S, Tsuzuki S. Synergistic activity of Card11 mutant and Bcl6 in the development of diffuse large B-cell lymphoma in a mouse model. *Cancer Sci.* 2016; 107:1572–1580.
36. Knittel G, Liedgens P, Korovkina D, Pallasch CP, Reinhardt HC. Rewired NFκB signaling as a potentially actionable feature of activated B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma. *Eur J Haematol.* 2016; 97:499–510.
37. Bu R, Bavi P, Abubaker J, Jehan Z, Al-haqawi W, Ajarim D, Al-Dayel F, Uddin S, Al-Kuraya KS. Role of nuclear factor-κB regulators TNFAIP3 and CARD11 in Middle Eastern diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma.* 2012; 53:1971–7.
38. Odqvist L, Montes-Moreno S, Sánchez-Pacheco RE, Young KH, Martín-Sánchez E, Cereceda L, Sánchez-Verde L, Pajares R, Mollejo M, Fresno MF, Mazorra F, Ruíz-Marcellán C, Sánchez-Beato M, et al. NFκB expression is a feature of both activated B-cell-like and germinal center B-cell-like subtypes of diffuse large B-cell lymphoma. *Mod Pathol.* 2014; 27:1331–7.
39. Young RM, Staudt LM. Targeting pathological B cell receptor signalling in lymphoid malignancies. *Nat Rev Drug Discov.* 2013; 12:229–43.
40. Dalla-Favera R. Molecular genetics of aggressive B-cell lymphoma. *Hematol Oncol.* 2017; 1:76–79.
41. Juskevicius D, Jucker D, Klingbiel D, Mamot C, Dimhofer S, Tzankov A. Mutations of CREBBP and SOCS1 are independent prognostic factors in diffuse large B cell lymphoma: mutational analysis of the SAKK 38/07 prospective clinical trial cohort. *J Hematol Oncol.* 2017; 10:70.
42. Gutiérrez-García G, Cardesa-Salzmann T, Climent F, González-Barca E, Mercadal S, Mate JL, Sancho JM, Arenillas L, Serrano S, Escoda L, Martínez S, Valera A, Martínez A, et al. Gene-expression profiling and not immunophenotypic algorithms predicts prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy. *Blood.* 2011; 117:4836–43.
43. Koboldt DC, Zhang Q, Larson DE, Shen D, McLellan MD, Lin L, Miller CA, Mardis ER, Ding L, Wilson RK. VarScan 2: somatic mutation and copy number alteration discovery in cancer by exome sequencing. *Genome Res.* 2012; 22:568–76.
44. Wang K, Li M, Hakonarson H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 2010; 38:e164.